

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**MATERIAIS A PARTIR DE ARGILAS PARA O ARMAZENAMENTO E
LIBERTAÇÃO LENTA DE ÓXIDO NÍTRICO PARA FINS TERAPÊUTICOS**

Doutoramento em Química

Química Tecnológica

Ana Cristina Pereira Fernandes

Tese orientada pelo Professor Doutor João Pires da Silva

2015

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia, por me ter concedido a Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/72058/2010), e à instituição de acolhimento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), em particular ao Departamento de Química e Bioquímica (DQB), que através de financiamento, instalações e serviços técnicos permitiram a realização desta investigação e a participação em diversos congressos onde pude apresentar parte do trabalho exposto na presente tese.

Ao meu orientador, Professor Doutor João Pires da Silva, os maiores e mais sinceros agradecimentos, por todo o seu apoio, estímulo, disponibilidade, confiança, conhecimento transmitido e orientação, indispensáveis à concretização deste trabalho. Já são alguns anos de trabalho em conjunto. Muito obrigada!

Ao Professor Doutor Moisés Pinto, um agradecimento especial. Pela disponibilidade e ensinamentos de técnicas importantes na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Antunes, que me introduziu no mundo das células e me ensinou tudo o que sei sobre elas, um agradecimento especial. Obrigada também a todo o pessoal do laboratório 8.4.61, que sempre se mostrou disponível para qualquer coisa que fosse necessária.

A todos os colegas do GAMA (Grupo de Adsorção e Materiais Adsorventes), aos que vieram e já partiram, e aos que continuam presentes, muito obrigada a todos. Em especial à Professora Doutora Ana Paula Carvalho, à Ana Mestre, à Marta Andrade e à Ana Galhetas, obrigada pela companhia, conversas e momentos bem passados nas horas de almoço e lanchinhos. Obrigada pelo apoio e disponibilidade que sempre mostraram quando necessário.

Um agradecimento especial à Mary Batista, pela ajuda e disponibilidade. Pela sua amizade e companhia constante... Muito obrigada.

Ao André, pela amizade e boa disposição constante. Obrigada por toda a ajuda prestada, por cuidares das minhas “pequeninas” sempre que necessário.

À Joana Fernandes, ainda que a passagem pelo laboratório tenha sido breve, ocupou o seu cantinho no meu coração.

Ao Osvaldo Ortet, amigo de longa data e companheiro em mais uma “viagem”, obrigada pela tua amizade, as grandes conversas e troca de ideias. Muito obrigada por tudo.

Aos meus pais o meu muito obrigado, sem a sua ajuda nunca teria chegado onde cheguei. Ao António que sempre esteve presente e me apoiou, aturando-me e ouvindo sem nada perceber. Por toda a ajuda prestada (...e desta vez não abusei) muito obrigada. Por tornares possível o impossível e por seres o Pai que és... Muito Obrigada.

À minha pequena Eva, que me mostra que a cada dia que passa estamos sempre a aprender algo novo.

Resumo

O óxido nítrico (NO) é uma das moléculas endógenas mais pequenas que possui funções reguladoras importantes em sistemas biológicos, tanto em processos fisiológicos como patológicos. Devido a esta multiplicidade de funções, o nível de concentração de NO ou, mais precisamente, o controlo da sua concentração, é crucial para evitar efeitos adversos, incluindo toxicidade. Os materiais nanoporosos possuem potencial interesse como sistemas de armazenamento e posterior libertação de óxido nítrico terapêutico no nosso organismo.

A biocompatibilidade é um requisito fundamental para que um material possa ser utilizado na libertação de fármacos. As argilas e minerais de argila desempenham um papel importante na área medicinal a nível de produtos farmacêuticos. Neste trabalho, foram preparados materiais nanoporosos de base argilosa. Prepararam-se argilas com pilares de óxidos de metais a partir de duas argilas naturais, Montmorilonite e Sepiolite, que possuem características distintas. Foram também preparadas argilas por modificação com moléculas orgânicas, nomeadamente com o aminoácido L-histidina. Foram ainda obtidas argilas sintéticas com cobalto na sua estrutura e com as menores dimensões de partículas das argilas estudadas neste trabalho.

A caracterização dos materiais foi feita essencialmente por difração de raios X, adsorção de azoto a -196 °C e TG-DSC. Os dados cinéticos para o armazenamento e libertação de óxido nítrico, nos materiais preparados, foram obtidos quer em fase gasosa quer em fase líquida. Alguns dos materiais preparados permitem armazenar e libertar uma quantidade de NO com significado biológico, apresentando uma cinética de libertação lenta e linear. Os ensaios toxicológicos realizados com células HeLa em materiais selecionados mostraram que os materiais testados possuem baixa citotoxicidade.

No geral, os resultados obtidos mostraram pela primeira vez que materiais preparados a partir de argilas possuem importantes características para que sejam considerados no contexto da bio-disponibilidade de óxido nítrico.

Palavras-chave: óxido nítrico; Montmorilonite; Sepiolite; libertação de fármacos; adsorção; porosidade.

Abstract

Nitric oxide (NO) is one of the smallest endogenous molecules with a particularly important role in the regulation of several biochemical pathways of the human body. Because of this multiplicity of functions, the level of NO is crucial to avoid adverse effects including toxicity. Nanoporous materials have emerged as potential systems for the storage and delivery of exogenous NO.

Biocompatibility is a fundamental requirement for a material to be used in drug delivery. Clays and clay minerals play an important role in field of health products. In this work nanoporous materials were prepared from clay based solids. The prepared materials were metal oxide pillared clays from two natural clays, montmorillonite and Sepiolite, which have different structural characteristics. Clays modified with organic molecules, namely with L-histidine as well as synthetic smectite clays, with cobalt in its structure and the lowest particle size of the clays studied in this work, were obtained also.

Materials were characterized essentially by X-ray diffraction, nitrogen adsorption at -196 °C and TG-DSC. The kinetic data for the nitric oxide storage and release, in the prepared materials, were obtained both in gas and liquid phase. Some of the prepared materials were able to store and release an amount of NO with biological significance, and showed a slow release kinetics with, inclusively, an almost direct relation between the release fraction and the time. Toxicological assays in HeLa cells with selected materials showed that the materials present low cytotoxicity.

In general, the results obtained showed for the first time that clay based materials have relevant properties to be considered in the field of the bioavailability of nitric oxide.

Key Words: nitric oxide; montmorillonite; Sepiolite; drug delivery; adsorption; porosity.

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract.....	V
Índice Geral	1
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	13
Lista de Símbolos	15
Lista de Siglas/Abreviaturas	17
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	19
I.1 – Materiais porosos na libertação de fármacos	21
I.2 – Óxido Nítrico	21
I.3 – Armazenamento de NO para aplicações terapêuticas	23
CAPÍTULO II - OBJETIVOS	27
CAPÍTULO III - MATERIAIS	31
Capítulo IV – Parte Experimental	37
IV.1 – Preparação dos Materiais	39
IV.1.1 – Materiais a Partir da Montmorilonite	39
Pilares de Óxido de Alumínio	39
Pilares de Óxidos de Cobalto e Alumínio	39
Pilares de Óxido de Titânio	40
Impregnação com iões cobalto	40
IV.1.2 – Materiais a Partir da Sepiolite	40
Pilares de Óxido de Alumínio	41
Troca iónica com iões cobalto e zinco.....	41
Pilares de Óxido de Titânio	41
IV.1.3 – “Organoclays”	41
IV.1.4 – Argilas sintéticas	42

IV.2 – Técnicas de Caracterização	43
IV.2.1 - Difração de Raios X.....	43
Condições de análise	44
IV.2.2 – Espectroscopia de infravermelho por refletância difusa	45
Condições de análise	45
IV.2.3 – TG-DSC	45
Condições de análise	46
IV.2.5 – DLS	46
Condições de análise	46
IV.2.4 – Adsorção de N ₂ a -196 °C.....	47
Adsorção de gases ou vapores	47
Isotérmicas de Adsorção e sua classificação	48
Condições de análise	50
IV.2.5 Espectroscopia de Absorção Atômica.....	51
Condições de análise	51
IV.2.5 Microscopia Eletrônica de Varrimento	52
Condições de análise	52
IV.3 – Estudos de Adsorção/Libertação de Óxido nítrico.....	53
Adsorção/Libertação de NO em fase gasosa	53
Libertação de NO em fase líquida	54
Método da oxi-hemoglobina ⁸⁶	55
Preparação da oxi-hemoglobina ⁸⁶	55
IV.4 – Ensaios Toxicológicos.....	57
IV.4.1 – Cultura Celular	57
Descongelamento das células	57
Passagem das células	58
Plaqueamento das células	58
IV.4.2 – Ensaios de fluorescência com Alamar Blue	58

IV.4.3 – Ensaio de “scratch”	59
Condições de Ensaio.....	59
IV.5 – Ensaio Eletroquímico	59
Calibração do eletrodo.....	60
Condições de análise	62
Capítulo V – Resultados e Discussão	63
V-I Materiais a partir da Montmorilonite	65
V.I.1 – Caracterização dos materiais.....	67
V.I.2 – Estudos de adsorção e de liberação de NO	71
V.I.2.1 – Fase gasosa	71
V.I.2.2 – Fase líquida	77
V.I.3 – Conclusão	82
V-II Materiais a partir da Sepiolite.....	89
V.II.1 – Caracterização dos materiais	91
V.II.2 – Estudos de adsorção e de liberação de NO	97
V.II.2.1 – Fase gasosa.....	97
V.II.2.2 – Fase líquida	101
V.II.3 - Conclusão	105
V-III - “Organoclays”	107
V.III.1 – Caracterização dos materiais	109
V.III.2 – Estudos de adsorção e de liberação de NO.....	116
V.III.2.1 – Fase gasosa	116
V.II.2.2 – Fase líquida	120
V.III.3 – Conclusão	124
V-IV – Argilas Sintéticas	127
V.IV.1 – Caracterização dos materiais.....	129
V.IV.2 – Estudos de adsorção e de liberação de NO.....	136
V.IV.2.1 – Fase gasosa	136

V.II.2.2 – Fase líquida	139
V.IV.3 – Conclusão	143
V.V – Estudos de Adsorção e Libertação de NO - Comparação de Materiais.....	145
V.V.1. - Fase gasosa	147
V.V.2 – Fase líquida	150
V.VI – Ensaio Toxicológicos.....	153
V.VI.1 – Ensaio de fluorescência – Viabilidade em função do tempo de contacto.	156
Materiais a partir da Montmorilonite.....	157
Materiais a partir da Sepiolite.....	158
“Organoclays”	159
Argilas sintéticas	160
V.VI.2 – Ensaio de fluorescência – Viabilidade em função da concentração	161
Viabilidade na presença de NO	162
V.VI.3 - Ensaio de “scratch”	163
V.VI.3 – Conclusão	166
Capítulo VI – Conclusão Geral	167
Capítulo VII – Perspetivas Futuras.....	171
Capítulo VIII – Referências Bibliográficas	175
Anexos.....	183
Anexo I – Parte experimental	iii
Anexo II – Ensaio Eletroquímicos	ix
A.II.1 - Calibração do eléctrodo de NO	xi
A.II.2 – Ensaio de estabilidade do sinal do eléctrodo.....	xii
A.II.3 – Libertação de NO de amostras	xiii
A.II.4 – Conclusão.....	xv
Anexo III – Isotérmicas de Adsorção de Azoto a -196 °C	xvii
Anexo IV – Espectros de UV-Vis e IV	xxvii
Anexo V – Artigos publicados no âmbito desta tese.....	xxxiii

Anexo V – Artigos publicados no âmbito desta tese.....	li
Anexo VI – Outros artigos	lxxix

Índice de Figuras

Figura I. 1 - Reações comuns do NO.....	22
Figura I. 2 - Síntese de NO a partir da oxidação da L-Arg catalisada pela NOS. ¹¹	23
Figura I. 3 - Método para armazenar NO que passa pela formação de sais de diazónio. A libertação de NO dá-se em contacto com água. ²¹	24
Figura III. 1 - Estrutura das esmectites, com folhas tetraédricas (castanho) e folhas octaédricas (verde). ⁴¹	34
Figura III. 2 - Estrutura da Sepiolite (folhas tetraédricas a branco e folhas octaédricas a laranja) ⁴¹	35
Figura IV. 1 - Difração de raios X por um cristal, de acordo com a teoria de W. L. Bragg. ⁷⁷	44
Figura IV. 2 - Tipos de isotérmicas de adsorção. ⁵¹	48
Figura IV. 3 - Instrumentação para determinação das isotérmicas de adsorção de N ₂ a -196 °C	51
Figura IV. 4 - Espectrofotómetro de Absorção Atómica.....	52
Figura IV. 5 – Instrumentação para recobrimento a ouro (esquerda) e microscópio eletrónico de varrimento (direita).	53
Figura IV. 6 - Instalação para ensaios de adsorção/libertação de NO em fase gasosa.	54
Figura IV. 7 - a) Sistema para adsorção de NO, preparação para a fase líquida; b) Espectrofotómetro de UV-Visível.	55
Figura IV. 8 - Câmara de fluxo laminar. 1 – PBS, 2 – Tripsina, 3 – Meio de cultura, 4 – placa de cultura.	57
Figura IV. 9 – Esquema do eletrodo de NO. 1 – Membrana polimérica permeável ao NO, 2 – Manga protetora de aço inoxidável descartável que acomoda o par de eletrodos, 3 – par de eletrodos, de trabalho e referência, 4 – suporte da sonda, 5 – tampa que prende a manga protetora da sonda.....	60
Figura IV. 10 - Eletrodo medidor de NO.....	61
Figura IV. 11 – a)Variação do sinal da corrente após adição das alíquotas de nitrito, b)Curva de calibração.	61
Figura V.I. 1 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas):a) argila de partida e PILCs de alumínio, b) PILCs com titânio.	68

Figura V.I. 2 - Espectros de difração de raios X das PILCs obtidas a partir da Montmorilonite.* - Reflexões características da Montmorilonite. ⁹³	69
Figura V.I. 3 - Isotérmicas de adsorção de azoto a -196 °C.	70
Figura V.I. 4 - Distribuição de tamanho de poros.	71
Figura V.I. 5 - Adsorção de NO em fase gasosa (a 25 °C).	71
Figura V.I. 6 - Liberação de NO na fase gasosa (a 25 °C). a) ao fim de 2h; b) ao fim de 20 h.	73
Figura V.I. 7 - Massa de NO adsorvida e libertada, expressa por unidade de área superficial; "rápido" corresponde ao NO libertado na fase inicial de libertação, e "lento" corresponde ao restante NO libertado até ao final do ensaio.	74
Figura V.I. 8 – Fração libertada de NO (M/M ₀) na fase gasosa.	76
Figura V.I. 9 – Espectros de UV-Vis inicial e final após 2h de ensaio. Comparação entre o espectro da oxiHb (a))e alguns materiais após 2 h de libertação de NO(b), c), d)).	78
Figura V.I. 10 - Liberação de NO em fase líquida em função do tempo.	79
Figura V.I. 11 – Fração libertada de NO (M/M ₀) na fase líquida.	80
Figura V.II. 1 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas):a) argila de partida e PILC de óxido de alumínio; b) argila de partida, argila impregnada com iões cobalto e PILC de óxidos de titânio/cobalto; c) argila de partida, argila impregnada com iões zinco e PILC.	92
Figura V.II. 2 - Difractogramas de raios X de: a) Todas as amostras a uma maior largura de ângulo, b) PILCs obtidas a partir da Sepiolite a uma menor largura de ângulo.* - Reflexões características da Sepiolite. ¹⁰⁸	94
Figura V.II. 3 - Isotérmicas de adsorção de azoto a -196 °C.	95
Figura V.II. 4 - Distribuição de tamanho de poros.	97
Figura V.II. 5 - Adsorção de NO em fase gasosa (a 25 °C).	97
Figura V.II. 6 - Liberação de NO na fase gasosa (a 25 °C). a) ao fim de 2h; b) ao fim de 20 h.	99
Figura V.II. 7 – Fração libertada de NO (M/M ₀) na fase gasosa.	100
Figura V.II. 8 – Espectros de UV-Vis da hemoglobina inicial e final após 2h de ensaio de libertação de NO. Comparação entre a Sepiolite de partida (a))e as PILCs formadas a partir da Sepiolite (b), c), d)). (i – espectro inicial; f – espectro final).	102
Figura V.II. 9 - Liberação de NO em fase líquida em função do tempo.	103

Figura V.II. 10 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase líquida.	104
Figura V.III. 1- Difração de raios X da: a) Montmorilonite e respectivas argilas intercaladas com L-histidina, L-HM1 e L-HM2, b) Sepiolite e respectivas argilas intercaladas com L-histidina, L-HS1 e L-HS2.....	110
Figura V.III. 2 - Espectros de infravermelho da L-histidina pura, a) L-histidina na L-HM1 e L-HM2 e b) L-histidina na L-HS1 e L-HS2.	112
Figura V.III. 3 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas):a) Montmorilonite e respectivas amostras intercaladas com L-histidina, L-HM1 e L-HM2; b) Sepiolite e respectivas amostras intercaladas com L-histidina, L-HS1 e L-HS2.	114
Figura V.III. 4 - Isotérmicas de adsorção de azoto a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$	115
Figura V.III. 5 - Distribuição de tamanho de poros.....	116
Figura V.III. 6 - Adsorção de NO em fase gasosa (a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).	117
Figura V.III. 7- Liberação de NO na fase gasosa (a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). a) ao fim de 2h; b) ao fim de 20 h.	118
Figura V.III. 8 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase gasosa.	120
Figura V.III. 9 – Espectros de UV-Vis da hemoglobina inicial e final após 2h de ensaio de libertação de NO. Comparação entre: os materiais de Montmorilonite intercalada com L-histidina: a) L-HM1, b) L-HM2; e os materiais de Sepiolite intercalada com L-histidina c) L-HS1, d) L-HS2	121
Figura V.III. 10- Liberação de NO em fase líquida em função do tempo.....	122
Figura V.III. 11 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase líquida. a) MMT e materiais derivados b) Sepiolite e materiais derivados.	123
Figura V.IV. 1 - Difractogramas de raios X da Montmorilonite natural e dos materiais sintéticos. a) Intervalo de 2θ mais largo, b) intervalo de 2θ até 18°	130
Figura V.IV. 2 – Teste do etilenoglicol. Difractogramas de raios-X: a) CoAS-A e b) CoOS (1-amostra de partida, 2-amostra com etilenoglicol, 3- amostra sem etilenoglicol, após aquecimento a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$	131
Figura V.IV. 3 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas): Montmorilonite e argilas sintéticas.	132
Figura V.IV. 4 - Espectros de IV da Montmorilonite (MMT) e dos materiais preparados (CoAS-A, CoAS-B e CoOS).	133

Figura V.IV. 5 - Isotérmicas de adsorção de azoto a -196 °C.	134
Figura V.IV. 6 - Distribuição de tamanho de poros.	135
Figura V.IV. 7 - Micrografias, obtidas por MEV, das amostras: a) CoAS-A e b)CoOS..	135
Figura V.IV. 8 - Tamanho de partículas das amostras MMT, CoAS-A, CoOS, e CoAS-B determinado por DLS.	136
Figura V.IV. 9 - Adsorção de NO em fase gasosa (a 25 °C).	137
Figura V.IV. 10 - Libertação de NO na fase gasosa (a 25 °C).	138
Figura V.IV. 11 – Fração libertada de NO (M/M ₀) na fase gasosa.	138
Figura V.IV. 12 – Espectros de UV-Vis da hemoglobina inicial e final: após 2h de ensaio de libertação de NO com a) MMT, b) CoAS-A e 3 h de ensaio de libertação de NO com c) CoOS, d)CoAS-B. Nas figuras o “i” corresponde a espectro inicial e o “f”e ao espectro final.	140
Figura V.IV. 13 - Libertação de NO em fase líquida em função do tempo.	141
Figura V.IV. 14 – Fração libertada de NO (M/M ₀) na fase líquida.....	142
Figura V.V. 1 – Adsorção de NO em fase gasosa.	148
Figura V.V. 2 – Fração libertada de NO _{Ads}	149
Figura V.V. 3 - Libertação de NO em fase líquida.....	150
Figura V.VI. 1 - Microplacas plaqueadas para ensaios de fluorescência. a) Imediatamente após a adição de Alamar Blue, b)4 h após adição de Alamar Blue. A coluna C corresponde a poços apenas com células sem amostras e M corresponde a poços apenas com meio, sem células.	155
Figura V.VI. 2 –a) Células sem amostra; Células com: b) MMT, c) Sepiolite, d) Al-P, e) dCoTi(Cl)-P, f) AlS-P, g) TiCoS-P, h) L-HM1, i) L-HS1, j) CoAS-A, k) CoOS, l)CoAS-B.	156
Figura V.VI. 3 – Viabilidade das células após contacto com a Montmorilonite e amostras preparadas a partir da Montmorilonite 24 e 72 h, com uma concentração de 450 µg mL ⁻¹ . Cada coluna corresponde a uma média de valores (n = 216) ± DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h.	157
Figura V.VI. 4 – Viabilidade das células após contacto com a Sepiolite e amostras preparadas a partir da Sepiolite 24 e 72 h, com uma concentração de 450 µg mL ⁻¹ . Cada coluna	

corresponde a uma média de valores ($n = 216$) \pm DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h.	158
Figura V.VI. 5 – Viabilidade das células após contacto com as argilas naturais, Montmorilonite e Sepiolite, e amostras preparadas a partir destas argilas por intercalação com L-histidina (L-HM1 e L-HM2) 24 e 72 h, com uma concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada coluna corresponde a uma média de valores ($n = 216$) \pm DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h.	159
Figura V.VI. 6 – Viabilidade das células após contacto com a Montmorilonite e as argilas sintéticas. 24 e 72 h, com uma concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada coluna corresponde a uma média de valores ($n = 216$) \pm DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h...	161
Figura V.VI. 7 - Viabilidade das células após contacto com os materiais a diferentes concentrações após um período de incubação de 24 h. Cada coluna representa uma média de valores ($n = 216$) \pm DP.	161
Figura V.VI. 8 – Viabilidade das células após 24 h incubação com os materiais (sem e com NO) As colunas são a média de valores ($n = 72$) \pm DP. Colunas a cheio materiais sem NO, colunas tracejadas materiais com NO.....	163
Figura V.VI. 9 – Fotografias do ensaio de scratch das células: sem material, em contacto com os materiais sem NO e em contacto com os materiais com NO. Fotos aos tempos inicial, 8 h e 72 h.	164
Figura V.VI. 10 – Diminuição do “scratch” ao longo do tempo: a) no controlo e na presença de al	165

Índice de Tabelas

Tabela V.I. 1 - Parâmetros texturais, onde, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA e d_{001} é o espaçamento basal.	69
Tabela V.I. 2 - Adsorção e liberação de NO em fase gasosa.	72
Tabela V.I. 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a liberação em fase gasosa	77
Tabela V.I. 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.....	79
Tabela V.I. 5 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a liberação em fase líquida.....	81
Tabela V.II. 1 - Parâmetros texturais, onde, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA.	96
Tabela V.II. 2 - Adsorção e liberação de NO em fase gasosa.....	98
Tabela V.II. 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a liberação em fase gasosa	101
Tabela V.II. 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.	103
Tabela V.II. 5 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a liberação em fase líquida.....	105
Tabela V.III 1 - Parâmetros texturais, onde, d_{001} corresponde ao espaçamento basal, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA.	111
Tabela V.III 2 - Adsorção e liberação de NO em fase gasosa.....	117
Tabela V.III 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a liberação em fase gasosa.	119
Tabela V.III 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.....	122
Tabela V.III 5 - Resultados da aplicação dos modelos cinéticos para a liberação de NO em fase líquida.....	124
Tabela V.IV. 1 - Parâmetros texturais onde, d_{001} é o espaçamento basal, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA.	129

Tabela V.IV. 2 - Adsorção e liberação de NO em fase gasosa.	137
Tabela V.IV. 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a liberação em fase gasosa.	139
Tabela V.IV. 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.....	141
Tabela V.IV. 5 - Resultados da aplicação dos modelos cinéticos para a liberação de NO em fase líquida.....	143

Lista de Símbolos

λ – comprimento de onda

Θ – ângulo de incidência do feixe eletromagnético

d_{001} – espaçamento basal

$d(H)$ – raio hidrodinâmico

D – coeficiente de difusão translacional

T – temperatura

η - viscosidade

p - pressão

p/p^0 – pressão relativa

n^a – quantidade adsorvida à pressão pA

n_m^a – quantidade adsorvida na monocamada

A_{BET} – área específica, determinada pelo método BET

V_μ - volume microporoso

V_m – volume mesoporoso

E_0 – parâmetro energético da equação D-A

M – quantidade de NO libertada ao longo do tempo

M_0 – quantidade total de NO libertada

M/M_0 – fração libertada ao longo do tempo

t – tempo

k – constante cinética

k_d – coeficiente de difusão de Fick

k_r – coeficiente de relaxação

n – expoente de libertação

w – volume adsorvido

w_0 – volume total de adsorção

A – potencial de adsorção

R – constante dos gases perfeitos

Lista de Siglas/Abreviaturas

TG-DSC – do inglês “Thermogravimetry-Differential Scanning Calorimetry”, termogravimetria com calorimetria diferencial de varrimento

MOFs – do inglês “metal-organic frameworks”

MMT - Montmorilonite

PILCs – do inglês “Pillared Interlayered Clays”, argilas com pilares

Al-PILCs – argilas com pilares de óxido de alumínio

“OrganoClays” – argilas intercaladas com moléculas orgânicas

TMOS – tetrametilortossilicato

DRX – Difração de Raios X

DRIFT – do inglês “Diffuse Reflectance by Infrared Fourier Transform” refletância difusa com transformada de Fourier

DLS – do inglês “Dinamic Light Scatering”, espalhamento dinâmico de luz

MEV – microscopia eletrônica de varrimento

IV – infravermelho

FTIR – do inglês “Fourier Transform InfraRed spectroscopy”, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

KBr – brometo de potássio

BET – Brunauer, Emmett, Teller

BJH – Barret, Joyner, Halenda

DFT – do inglês “Density Functional Theory”, teoria-do funcional da densidade

D-A – Dubinin-Astakhov

EAA – Espectroscopia de Absorção Atômica

PTFE – poli-tetrafluoretileno

UV-Vis – Ultravioleta-Vivível

Hb - hemoglobina

oxiHb – oxi-hemoglobina

metHb – meta-hemoglobina

HeLa – Henrietta Lacks

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

FBS – do inglês “Fetal Bovine Serum”, soro fetal bovino

PBS – do inglês “Phosphate-buffered saline”, tampão fosfato salino

AIC – do inglês “Akaike Information Criterion”, critério de informação de Akaike

ETG – etilenoglicol

AS – ácido silícico

DP – Desvio padrão

Capítulo I

Introdução Geral

I.1 – Materiais porosos na liberação de fármacos

Ao longo das últimas décadas, tem havido um rápido crescimento na área da liberação de fármacos em busca de sistemas mais eficientes, dado que o número de fármacos que tem vindo a ser desenvolvido, mas que não tem aplicações efetivas devido à limitada bio-disponibilidade, é elevado.^{1, 2} Os sistemas de liberação controlada possibilitam que os fármacos atinjam o tecido alvo com uma precisão temporal e espacial. Geralmente, os sistemas de liberação controlada de fármacos permitem manter a concentração do fármaco, no tecido alvo, num intervalo de concentração terapêutica e sob o limiar de toxicidade, o que melhora a eficácia terapêutica e reduz a toxicidade.^{1, 3-6}

Vários materiais têm vindo a ser testados e propostos como componentes de novos sistemas de liberação de fármacos e muitos esforços têm vindo a ser feitos para sintetizar materiais com propriedades biológicas, tecnológicas e mecânicas adaptadas para cada tipo de aplicação na liberação de fármacos.⁵ Materiais incluindo, sílicas mesoporosas, materiais de carbono bem como matrizes poliméricas têm sido usados como substratos para a liberação de fármacos.⁵ Embora vários destes materiais consigam armazenar elevadas quantidades de fármaco é necessário ter especial atenção quanto à forma e tamanho das partículas, uma vez que são fatores que interferem na biocompatibilidade do material. Por outro lado, estes materiais têm vindo a ser estudados essencialmente, para a liberação de moléculas orgânicas e fármacos de dimensões consideráveis tais como, péptidos, ibuprofeno, aspirina, amoxicilina, entre outros, que à temperatura ambiente são usualmente sólidos.^{7, 8}

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver materiais para liberação de óxido nítrico (NO), uma molécula que é importante em vários processos biológicos mas que apresenta pequenas dimensões e que é gasosa à temperatura ambiente, características que levantam problemas específicos e que dificultam a sua liberação controlada.

I.2 – Óxido Nítrico

Há algumas décadas atrás, o óxido nítrico era conhecido apenas como sendo um gás poluente e tóxico. Ironicamente, no final da década de 80 do século passado, descobriu-se que o NO pode atuar como um mensageiro biológico em mamíferos. Esta descoberta levou à atribuição do prémio Nobel de medicina em 1998 a Furchgott, Ignarro e Murad.⁹ Comparativamente a outros fármacos, o NO é uma das moléculas mais pequenas, sendo das primeiras moléculas gasosas, a serem usadas como fármacos.¹⁰⁻¹²

O óxido nítrico é sintetizado por várias células, tendo sido identificado como fator de relaxamento derivado das células do endotélio.^{10, 13} O NO está envolvido em diversas funções fisiológicas tais como, processos de defesa imunitária, inibição da agregação plaquetária, regulação da pressão arterial, cicatrização de feridas, neurotransmissão e, inclusivamente, na formação de novos neurónios.^{10, 11, 13-17} Esta molécula encontra-se assim envolvida em inúmeros processos fisiológicos, farmacológicos e patofisiológicos. No entanto, estes efeitos dependem da sua distribuição temporal e espacial, assim como da sua concentração.¹³ Devido a esta multiplicidade de efeitos, o nível de concentração de NO ou, mais precisamente, o controlo da sua concentração, é essencial a fim de evitar efeitos adversos, ou mesmo, toxicidade. Muitas metalo-proteínas podem reagir com NO e a sua exposição a altas concentrações de NO podem resultar na inibição das respetivas funções. Sob condições fisiológicas a concentração de NO no sangue humano pode variar entre 10^{-6} M a 10^{-7} M, sendo que durante processos inflamatórios, infeções ou processos degenerativos, a sua concentração se encontra no limite mais elevado.^{18, 19}

Como já foi referido, em condições normais de pressão e temperatura o NO é um gás. A sua solubilidade em água é moderada, sendo mais solúvel em solventes apolares. Desta forma, quando presente em sistemas biológicos tende a concentrar-se em ambientes lipofílicos, como membranas ou partes hidrofóbicas de proteínas. O seu carácter radicalar confere-lhe um tempo de meia-vida reduzido, entre 2 a 30 s (sendo cerca de 4 a 10 s *in vitro*),^{11, 13, 20} e uma elevada reatividade com outros compostos biológicos como o ião superóxido (O_2^-), o oxigénio molecular (O_2) e os tióis, entre outros - Figura I. 1.^{11, 13}

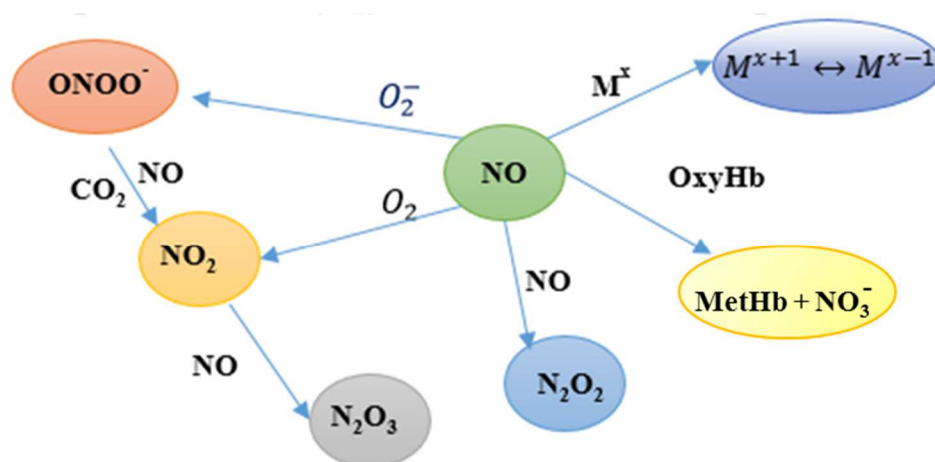


Figura I. 1 - Reações comuns do NO.

Conforme já referido o óxido nítrico é produzido por várias células, por exemplo, nas células endoteliais a partir da L-arginina (L-Arg) livre intracelular. É sintetizado a partir da reação da L-Arg com o oxigénio molecular, na presença da enzima NO sintase (NOS) - Figura I. 2.^{11, 13}

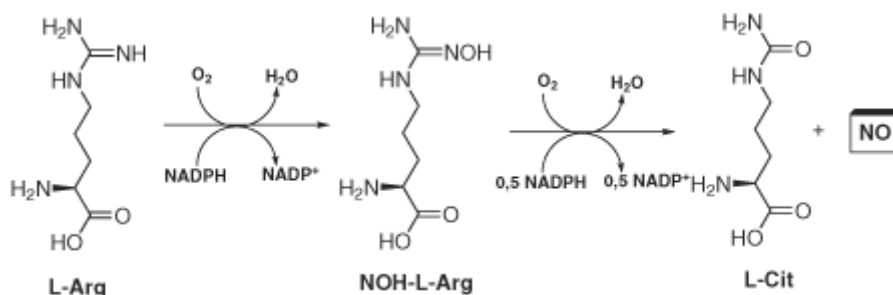


Figura I. 2 - Síntese de NO a partir da oxidação da L-Arg catalisada pela NOS.¹¹

Muitos foram já os estudos efetuados sobre a toxicidade e o desempenho biológico do NO, usando diversas formas de libertação. Dadores homogêneos que libertam diretamente NO no organismo existem e estão bem avançados em certas áreas, no entanto estão limitados pela natureza da sua libertação sistémica que pode dar origem a efeitos secundários indesejáveis. A inalação de NO tem sido já usada no tratamento de problemas pulmonares, mas o efeito é sistémico e o controlo da metodologia é bastante complexo. Deste modo, uma das maiores preocupações relativas à libertação de NO, consiste em estabelecer um meio de libertação controlado e lento de NO no organismo. Torna-se assim necessário encontrar novas formas, materiais e tecnologias para armazenar NO e libertá-lo em quantidades biológicas.²¹

I.3 – Armazenamento de NO para aplicações terapêuticas

A estratégia para o armazenamento e libertação de NO passa por um desencadear de mecanismos, particularmente em contacto com um meio biológico. Alguns materiais têm sido propostos como agentes de entrega de NO exógeno. Talvez os mais avançados sejam aqueles à base de polímeros funcionalizados com aminas secundárias, que na reação com NO formam sais diazónio.²¹ Duas moléculas de NO reagem com cada amina, dando origem ao material cujo nome trivial é descrito como NONOato, e quando em contacto com o meio biológico, a um determinado pH voltam a formar o NO - Figura I. 3.^{21, 22} Conforme indicado

por alguns autores, e porque podem também libertar poliaminas como produtos secundários, as quais possuem atividade carcinogénica e pro-inflamatória, a aplicabilidade de materiais à base de poliaminas pode ser limitada em algumas circunstâncias.^{23, 24}

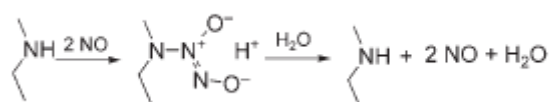


Figura I. 3 - Método para armazenar NO que passa pela formação de sais de diazónio. A libertação de NO dá-se em contacto com água.²¹

As aplicações dos materiais testados na libertação de NO incluem materiais antibacterianos e agentes de libertação tópica para dermatologia e preservação de órgãos. As aplicações tópicas são, provavelmente, as mais próximas da comercialização e o armazenamento de NO em polímeros, incorporados em ligaduras, estão em ensaios clínicos para o tratamento da leishmaniose.²¹

Mais recentemente, materiais como os zeólitos e os MOFs (do inglês metal-organic frameworks) têm vindo a ser estudados para o armazenamento e libertação lenta de NO.²⁵⁻³¹ Os zeólitos³², que são bem conhecidos quanto à sua toxicologia²¹, possuem uma capacidade de libertação de NO semelhante à dos NONOatos. O NO adsorve-se aos zeólitos com interações fortes e específicas com os catiões da estrutura, sendo assim a capacidade de retenção do NO bastante elevada, o que, por outro lado, dificulta a sua libertação, sendo necessário recorrer também a outros mecanismos de libertação, nomeadamente a sua exposição a um meio aquoso.^{21, 22}

Os MOFs,^{33, 34} que possuem centros metálicos acessíveis ao NO, originam o mesmo tipo de ligação que ocorre com os zeólitos, mas possuem uma capacidade de armazenamento muito superior. Assim, visto que o NO se adsorve fortemente aos MOFs a sua libertação terá de passar por mecanismos de libertação semelhantes aos dos zeólitos, com a desvantagem das estruturas metal-orgânicas serem menos estáveis em meios hidrofílicos que os polímeros ou os zeólitos. Por outro lado, a toxicidade dos MOFs ainda está a ser estudada pelo que a sua aplicação em situações biológicas ainda não está provada.^{21, 25}

Embora vários estudos tenham já sido feitos, continua a procura de materiais que apresentem uma boa relação adsorção/armazenamento/libertação de NO, e que não apresentem toxicidade de modo a que possam ser aplicados em meio biológico.

Capítulo II

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho consistiu na preparação de materiais nanoporosos de base argilosa, que possam ser usados como sistemas de armazenamento e posterior libertação de óxido nítrico. Como materiais de partida utilizaram-se duas argilas naturais, Montmorilonite e Sepiolite, que possuem características acentuadamente diferentes no que diz respeito à respetiva estrutura e composição química, tendo-se também obtido e estudado uma argila sintética. A Montmorilonite possui uma estrutura lamelar que lhe permite propriedades únicas tais como intercalação e expansão. A Sepiolite apresenta uma boa capacidade de adsorção embora não seja tão passível de sofrer expansão. Os objetivos fundamentais que presidiram às modificações das argilas de partida, nomeadamente à introdução de porosidade pelo uso de vários tipos de óxidos metálicos ou de moléculas orgânicas, bem como à preparação de argilas sintéticas, foram o aumento das quantidades adsorvidas de NO e a procura de um perfil de libertação lento e constante. Nas modificações efetuadas teve-se também sempre presente o objetivo de não diminuir, e até se possível aumentar, as características de biocompatibilidade dos materiais preparados em relação às argilas de partida.

Capítulo III

Materiais

A biocompatibilidade é um requisito fundamental para que um material possa ser utilizado na libertação de fármacos.³⁵ As argilas e minerais de argila desempenham já atualmente um papel importante na área medicinal a nível de produtos farmacêuticos. Os minerais de argila funcionam quer como princípios ativos quer como excipientes em preparações farmacêuticas. Além disso, os minerais de argila podem ser efetivamente utilizados no desenvolvimento de novos sistemas de libertação de fármacos. Para além da sua estrutura e composição, deve ter-se em conta outros fatores importantes para a determinação das suas propriedades e aplicações.³⁵⁻³⁷

As argilas são definidas como sendo materiais naturais, terrosos, finamente divididos constituídas por minerais de argila, usualmente aluminossilicatos hidratados. Estas dividem-se em vários grupos, sendo que neste trabalho apenas se estudaram argilas de dois grupos.

A Montmorilonite pertence ao grupo das esmectites, sendo a mais abundante neste grupo, cuja fórmula química geral é $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$. Possui partículas de tamanhos que podem variar de 0,1 a 2 μm . Pertence ao grupo dos filossilicatos do tipo 2:1 que se caracterizam por uma estrutura lamelar composta por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumínio (daqui a sua classificação como tipo 2:1), que são unidas entre si por átomos de oxigénio comuns a ambas folhas - Figura III. 1. Para compensar a deficiência em carga positiva, existem catiões troca entre as folhas sendo mais frequentemente iões sódio ou cálcio.^{36, 38-40}

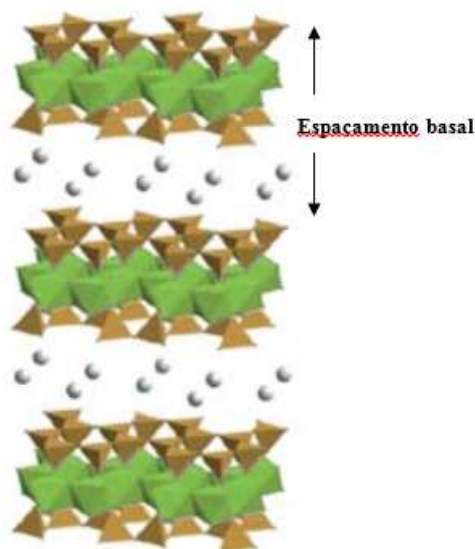


Figura III. 1 - Estrutura das esmectites, com folhas tetraédricas (castanho) e folhas octaédricas (verde).⁴¹

A Sepiolite pertence ao grupo de minerais de argila compostos por silicatos de alumínio e magnésio com uma estrutura do tipo 2:1 invertida, cuja fórmula de célula unitária teórica é $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{OH}_2)_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$.⁴²⁻⁴⁵ A estrutura geral da Sepiolite é formada por alternância de blocos e túneis - Figura III. 2. Os blocos são compostos por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de magnésio. A inversão periódica destes blocos origina os túneis.^{42, 44, 46} Estes túneis (canais) têm dimensões de $1,1 \times 0,4$ nm, sendo acessíveis a pequenas moléculas.³⁹ A dimensão dos cristais de Sepiolite pode variar entre 200 a 4000 nm de comprimento, 10 e 30 nm de largura e 5 e 10 nm de espessura.^{43, 45, 46} A Sepiolite pode apresentar área específica elevada, com valores entre 200 a 500 m^2g^{-1} , resultante não apenas da pequena dimensão das partículas, mas também devido à sua morfologia e túneis inter-cristalinos.^{43, 45} A Sepiolite tem sido comumente usada em diversas aplicações tecnológicas e industriais. Muitas destas aplicações baseiam-se nas suas propriedades de adsorção e de catálise. Embora não seja geralmente considerada como um mineral expansível, ao contrário da Montmorilonite, existem estudos que relatam a possibilidade de aumentar o seu espaçamento basal por intercalação com outras espécies.⁴⁵



Figura III. 2 - Estrutura da Sepiolite (folhas tetraédricas a branco e folhas octaédricas a laranja)⁴¹.

A catálise e adsorção requerem materiais com elevada porosidade e área superficial específica. Embora as argilas, tal como a Montmorilonite, apresentem uma área superficial específica baixa, entre 20 a 70 m²g⁻¹, a sua estrutura em camadas pode ser expandida através de pilares inorgânicos ou orgânicos.

As argilas com pilares (PILCs, do acrónimo inglês “Pillared Interlayered Clays”) são materiais nanoporosos obtidos por intercalação de espécies inorgânicas em argilas expansíveis naturais ou sintéticas. As PILCs são obtidas através da permuta dos iões de troca (usualmente Na⁺ ou Ca²⁺) com outros catiões mais volumosos. Das espécies inorgânicas intercalantes, que por calcinação formam os pilares, as mais estudadas são os catiões oligoméricos de alumínio e zircónio, embora outras a partir do zinco, cobalto e titânio também tenham vindo a ser estudadas.⁴⁷ Os catiões oligoméricos de Al³⁺, designados por iões de Keggin e os de Zr⁴⁺, apresentam a fórmula geral [Al₁₃O₄(OH)₂₄·12H₂O]⁷⁺ e [Zr₄(OH)₁₄·10H₂O]²⁺. O facto da espécie de alumínio ser uma das mais estudadas está seguramente relacionado não só com o elevado conhecimento da química do alumínio em solução como também pela analogia das Al-PILCs com outros materiais, nomeadamente os zeólitos, em que as propriedades ácidas estão associadas à presença de alumínio.^{48, 49}

Os oligómeros aumentam o espaçamento basal das argilas e são posteriormente convertidos em pilares estáveis de óxidos do metal usado, por desidratação e deshidroxilação, através de um passo de calcinação.^{47, 50} Os materiais assim preparados apresentam uma porosidade permanente constituída essencialmente por microporos (poros com uma largura inferior a 2 nm), embora também possa ser obtida mesoporosidade (largura entre 2 a 50 nm).^{51, 52}

As PILCs com pilares de óxido de titânio e cobalto poderão ter interesse no que diz respeito à adsorção e libertação de NO uma vez que após a formação dos pilares, existe a possibilidade de que os iões cobalto e titânio possam desenvolver interações específicas com

o NO. Ambos os metais, o titânio e o cobalto, apresentam baixa toxicidade e são, portanto, biologicamente compatíveis com o organismo.^{53, 54}

Os minerais de argila podem ser também substancialmente modificados substituindo os catiões interlamelares por moléculas orgânicas. Para além disso, tem vindo a haver uma crescente atenção no que diz respeito à incorporação de domínios biológicos e motivos peptídicos em materiais sintéticos.^{55, 56} Os α -aminoácidos, cuja formula geral é do tipo $H_2NCH(R)CO_2H$, são blocos de construção de sistemas vivos. A utilização destes compostos em materiais híbridos aumenta a biocompatibilidade de tais sistemas e permite interações com biomoléculas.^{55, 57} Entre estes materiais híbridos, as “organoclays” (argilas modificadas com moléculas orgânicas) foram estudadas em vários domínios científicos, devido à acessibilidade de minerais de argila natural e da sua capacidade de incorporar uma grande variedade de moléculas funcionais.^{55, 56}

A modificação de Montmorilonites e Sepiolites com aminoácidos naturais tais como L-histidina não foi ainda previamente relatada. A L-histidina é um aminoácido semi-essencial, utilizado em vários suplementos alimentares.⁵⁸ Este aminoácido possui três grupos amina que podem potencialmente interagir com o NO, tornando-se interessante estudar a adsorção e libertação de óxido nítrico a partir de argilas modificadas com L-histidina. Apenas outro aminoácido possui 3 grupos amina, que é a arginina, uma molécula que está diretamente envolvida na produção de NO no organismo.⁵⁹

Capítulo IV

Parte Experimental

IV.1 – Preparação dos Materiais

IV.1.1 – Materiais a Partir da Montmorilonite

Como material de partida foi utilizada uma argila natural, do estado do Wyoming, EUA, (aqui identificada como MMT), que possui as seguintes características: área superficial específica de $20 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, volume total de poros de $0,033 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e espaçamento basal de 1,26 nm.

A partir da MMT foram preparadas argilas com pilares, PILCs (do inglês Pillared Interlayered Clays) usando diferentes oligocatiões (alumínio, cobalto e titânio).

Pilares de Óxido de Alumínio

Para obter o material com pilares de óxido de alumínio foi seguido um procedimento previamente proposto⁶⁰ que se encontra detalhado em anexo (Figura A.I. 1). De um modo resumido, o oligômero foi preparado adicionando, gota a gota sob forte agitação, uma solução de NaOH 0,5 M (BDH Chemicals Ltd, 98 %) a uma solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M (Fluka, > 98 %), com uma razão OH/Al de 2. A solução oligomérica foi deixada em agitação a 60 °C durante 2 h. A solução oligomérica, após ter sido neutralizada com solução de amônia a 25 % (Merk) até pH = 6, foi adicionada a uma suspensão de 5 % de MMT em água desionizada (com 20 miliequivalentes de alumínio por grama de argila), deixada previamente em agitação durante a noite. A amostra foi lavada em membrana de diálise (membrana de celulose, 43 mm de largura, Sigma-Aldrich), para remoção dos íons cloreto, foi seca e finalmente calcinada a 400 °C durante 2 h. O material daí resultante foi denominado de Al-P.

Pilares de Óxidos de Cobalto e Alumínio

Para preparar a PILC de pilares mistos de alumínio e cobalto (denominada de CoAl-P) foi adicionado $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, p.a.) a uma solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mol Co^{2+} : 3 mol Al^{3+}). Posteriormente foi seguido o mesmo procedimento indicado para a preparação da PILC de alumínio.

Pilares de Óxido de Titânio

Para preparar as PILCs com óxido titânio foram usados dois compostos de partida, TiCl_4 (Fluka, > 98 %) e $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (Aldrich, p.a.), os materiais obtidos foram designados por $\text{Ti}(\text{Cl})\text{-P}$ e $\text{Ti}(\text{Et})\text{-P}$, respetivamente.

O método de preparação destas argilas com pilares baseou-se na literatura.^{53, 54, 61-65} Inicialmente prepararam-se os oligocatiões. Para preparar a $\text{Ti}(\text{Cl})\text{-P}$, a uma solução de HCl 6 M (Carlo Erba, 37 %) foi adicionado TiCl_4 , gota a gota sob forte agitação. A solução obtida foi diluída com água destilada até perfazer os 100 mL. Após envelhecimento, a solução oligomérica foi adicionada a uma suspensão de argila em água. Findo o tempo de reação (3 h) a mistura foi seca e calcinada de modo a se obter a respetiva PILC.^{53, 54, 61} O oligómero precursor da $\text{Ti}(\text{Et})\text{-P}$, foi preparado adicionando $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ a uma solução de HCl 5 M de forma a se obter uma razão $\text{H}^+/\text{Ti}^{4+} = 2,5$. O oligómero foi então adicionado à suspensão de argila, tendo a mistura, posteriormente, sido lavada, seca e calcinada.⁶²⁻⁶⁵ Os detalhes das sínteses encontram-se esquematizados em Anexo (Figuras A.I 2 e A.I.3).

Impregnação com iões cobalto

Parte da amostra $\text{Ti}(\text{Cl})\text{-P}$ foi posteriormente modificada, com a impregnação de nitrato de cobalto, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, < 98 %). Foram usadas duas vias de impregnação, “seca”⁶⁶ e “húmida”⁶⁷, adaptadas da literatura. Na impregnação por via seca, uma solução de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi misturada com 0,5 mg de $\text{Ti}(\text{Cl})\text{-P}$ na proporção de 0,5 % em peso de iões cobalto/PILC. A mistura ficou a impregnar durante 18 h a 60 °C, tendo sido posteriormente calcinada, o material obtido por esta via foi designado por $\text{dCoTi}(\text{Cl})\text{-P}$. Pelo segundo método de impregnação, 0,75 mg de $\text{Ti}(\text{Cl})\text{-P}$ foram adicionados a 24 mL de solução $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M. A mistura foi deixada a agitar durante 1 h e após 17 h de envelhecimento foi lavada e colocada durante 1 h a 200 °C na estufa e posteriormente calcinada. O material obtido por esta via foi designado por $\text{wCoTi}(\text{Cl})\text{-P}$. Ambas as amostras foram calcinadas a 400 °C durante 3 h.⁶⁸

IV.1.2 – Materiais a Partir da Sepiolite

Como material de partida foi utilizada uma argila natural, Sepiolite (Pangel S9, Tolsa S.A.) que possui as seguintes características: área superficial específica de 141 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, volume total de poros de 0,398 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ e espaçamento basal de 1,22 nm.

A partir da Sepiolite foram preparadas argilas com pilares, PILCs usando diferentes oligocatiões de alumínio e titânio. Previamente à formação de pilares de titânio fez-se uma troca iónica na argila com iões cobalto e zinco.

Pilares de Óxido de Alumínio

O procedimento para o material com pilares de óxido de alumínio a partir da Sepiolite foi igual ao descrito na secção IV.1.1 o qual se encontra detalhado em anexo (Figura A.I. 1). O material daí resultante foi denominado de AIS-P.

Troca iónica com iões cobalto e zinco

Foram efetuadas trocas iónicas da Sepiolite quer com acetato de cobalto ($((C_2H_3O_2)Co \cdot 4H_2O)$) quer com acetato de zinco ($((C_4H_6O_4)Zn_2 \cdot H_2O)$), ambos da Sigma-Aldrich, p. a.. De forma resumida, foram adicionados 5 g de Sepiolite a 400 mL de solução do respetivo acetato iónico a 0,05 M, deixando a agitar durante 24 h.²² Os materiais foram recuperados por centrifugação, lavados com água destilada e secos a 100 °C durante a noite. A estes materiais foi atribuída a designação de CoS e ZnS, respetivamente.

Pilares de Óxido de Titânio

A partir dos materiais obtidos por troca iónica, CoS e ZnS, prepararam-se PILCs com pilares de óxido de titânio a partir do etóxido de titânio, $Ti(OEt)_4$, tal como descrito anteriormente na secção II.1.1. Os materiais obtidos foram designados por $TiCoS-P$ e $TiZnS-P$, respetivamente. Ambas as amostras foram calcinadas durante 2 h a 400 °C, tendo esta temperatura sido seleccionada de acordo com informação da literatura respeitante à decomposição dos acetatos de cobalto e de zinco, assim como para a formação das PILCs de titânio.^{65, 69, 70}

IV.1.3 – “Organoclays”

Emprega-se usualmente o nome de “organoclay” para definir uma argila natural que tenha sido modificada com um composto orgânico.

Como argilas de partida foram usadas as duas argilas naturais MMT e Sepiolite, as quais foram intercaladas com L-histidina (Sigma-Aldrich, > 99 %), um aminoácido semi

essencial. Com cada uma das argilas foram preparados dois materiais, diferindo apenas no teor de L-histidina impregnado. O método de impregnação foi adaptado da literatura.⁵⁵

Fez-se uma suspensão de 2 g Montmorilonite em 100 mL de água desionizada a qual ficou em agitação durante 3 h a 80 °C. Entretanto, prepararam-se soluções de L-histidina a 0,02 e 0,06 M, a 80 °C, tendo-se ajustado o pH a 5,5 com HCl 2 M. A este pH a L-histidina é carregada positivamente potenciando, deste modo, a ocorrência de troca iônica entre o aminoácido e os iões troca das argilas. As soluções de L-histidina foram adicionadas à suspensão de argila, mantendo-se a agitação a 60 °C durante a noite. Por fim, os materiais preparados foram centrifugados, lavados e secos. Foram, assim, preparados quatro materiais: L-HM1 e L-HM2 (preparadas a partir da MMT), L-HS1 e L-HS2 (preparadas a partir da Sepiolite), em que L-H identifica a presença da L-histidina e os valores 1 e 2 correspondem aos materiais menos e mais concentrados no aminoácido, respetivamente.

IV.1.4 – Argilas sintéticas

Por norma as argilas naturais não possuem na sua estrutura uma grande variedade de metais de transição, por esse motivo tentou-se recriar uma esmectite com cobalto na sua estrutura, um metal de transição que, como já foi referido anteriormente, possui uma afinidade para com o NO.⁷¹ Na síntese destas argilas (adaptada da literatura⁷²⁻⁷⁴), uma fonte de silício é adicionada a $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Foram preparadas argilas com diferentes fontes de silício. Como primeira fonte de silício foi usado o ácido silícico (Sigma-Aldrich, 99.9 %, < 20 µm) e como segunda fonte de silício usou-se o TMOS (tetrametilortosilicato, Fluka, > 98 %).

Partindo do ácido silícico, a síntese teve duas variantes:

A) Adicionaram-se 7 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 100 mL de ácido silícico 45 mM, a pH = 3. De seguida, sob fluxo de azoto adicionou-se 1 g de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Sigma-Aldrich), para evitar a oxidação dos iões cobalto presentes, e NaOH 2 M gota a gota sob forte agitação. Após dois dias de agitação, à temperatura ambiente, a mistura reacional foi transferida para um autoclave onde ficou durante 50 h a 150 °C (esta amostra foi designada como CoAS-A).

B) Adicionaram-se 1,21 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 150 mL de água, seguido de 12,5 mL de NaOH 2 M, sob fluxo de azoto, deixando a agitar durante o dia. Após esse tempo adicionou-se 1 g de ditionito de sódio e 0,65 g de ácido silícico. A mistura ficou a agitar durante a noite,

ainda sob fluxo de azoto. Após a noite, a mistura foi transferida para um autoclave onde ficou durante 50 h a 150 °C (esta amostra foi designada como CoAS-B).

Após esta parte inicial, o procedimento foi o mesmo para as duas variantes, A) e B), a mistura foi centrifugada, lavada e deixada durante a noite numa solução de NaCl 1 M (Merck, 99,5 %). Posteriormente os materiais obtidos foram recuperados por centrifugação, lavados e secos.

Para o material preparado com TMOS, designado de CoOS, o procedimento foi o mesmo que o usado na vertente A) descrita anteriormente, mudando apenas a fonte de silício.

IV.2 – Técnicas de Caracterização

Os métodos mais utilizados para a identificação, quantificação e caracterização de aluminosilicatos incluem: difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por refletância difusa, DRIFT (do inglês Diffuse Reflectance by Infrared Fourier Transform), termogravimetria com calorimetria diferencial de varrimento (TG-DSC, do inglês Thermogravimetry-Differential Scanning Calorimetry), adsorção de azoto a -196 °C, espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês Dynamic Light Scattering), espectroscopia de absorção atômica e microscopia eletrônica de varrimento (MEV).

IV.2.1 - Difração de Raios X

Os raios X são radiações eletromagnéticas de comprimento de onda de cerca de 0,001 nm, que ocorrem na gama do espectro eletromagnético entre os raios gama e ultravioleta. A descoberta dos raios X, em 1895, por W. K. Röntgen, permitiu aos cientistas sondar estrutura cristalina a nível atômico, pois o comprimento de onda, λ , dos raios X era da mesma ordem de grandeza do tamanho atômico.⁷⁵ Uma utilização primária da técnica é a identificação e caracterização de compostos com base no seu padrão de difração.⁷⁶

A difração é um fenómeno de dispersão de ondas eletromagnéticas que ocorre quando uma onda encontra obstáculos, fendas, orifícios, grades e sulcos. Se a largura da fenda for da mesma ordem de grandeza do λ , ocorrerá interferência e do outro lado da fenda surgirá uma onda de mesmo λ . Quando raios X incidem num cristal, estes são espalhados por cada átomo, produzindo ondas esféricas. Os raios X difratados têm o mesmo comprimento de onda dos incidentes e resultam da aceleração e desaceleração de eletrões cujo movimento foi alterado pelos raios X incidentes. Entre os raios X refletidos ocorrerão

interferências construtivas e destrutivas. A interferência construtiva dos raios X difratados ocorre quando a diferença na distância percorrida por duas ondas difratadas idênticas for um número inteiro de comprimentos de onda, de modo que as duas ondas estejam em fase.⁷⁷

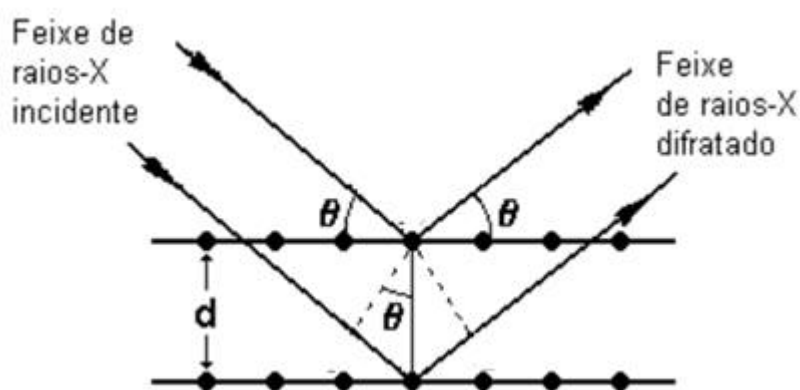


Figura IV. 1 - Difração de raios X por um cristal, de acordo com a teoria de W. L. Bragg.⁷⁷

Na Figura IV.1, as linhas horizontais representam planos atômicos de distância interplanar d , cujos átomos são centros difratantes da radiação incidente. A diferença total de caminho entre os dois raios mostrados é $2d \cdot \sin\theta$, onde a equação $n = 2d \sin \theta$ descreve as condições sob as quais ocorre difração. Esta é conhecida como sendo a Lei de Bragg, na qual n pode ser um qualquer número inteiro, de modo a que se observe um pico na intensidade da radiação difratada.

Condições de análise

Os difractogramas foram obtidos num difratômetro da marca Philips modelo PW 1730, com aquisição automática de dados (APD Phillips (v3.6B)) utilizando uma ampola de cobre. ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$), operando com uma tensão 40 kV e uma corrente de 30 mA

Foram feitos varrimentos entre 2 e 50 $^{\circ}2\theta$ (com *step size* de 0,02 $^{\circ}2\theta$ e *time per step* de 1,25 s), abrangendo um maior intervalo de difrações de modo a se poder caracterizar bem as amostras. Foram ainda realizados varrimentos a intervalos mais curtos entre 2 e 16 $^{\circ}2\theta$ (com *step size* de 0,02 $^{\circ}2\theta$ e *time per step* de 50 s), por forma a poder caracterizar bem a reflexão correspondente ao espaçamento basal e observar, deste modo, o resultado da formação de pilares nas argilas de partida.

IV.2.2 – Espetroscopia de infravermelho por refletância difusa

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica que se baseia na frequência específica de vibração (níveis vibracionais) dos átomos numa molécula ou mineral. Um espectro de IV é sensível à composição química, substituição isomórfica, arranjos ou modificações estruturais. No que diz respeito aos minerais de argilas, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma das técnicas mais informativas, não só relativamente à composição mineral e química de cristalina, mas também às interações de um mineral de argila com substâncias orgânicas ou inorgânicas.⁷⁸

A região espectral do infravermelho (IV) compreende três zonas de radiação, em relação à região do visível: longínquo ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$); intermédio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) e próximo ($4000\text{-}14000\text{ cm}^{-1}$). O FTIR é usado principalmente na zona intermédia, onde as vibrações de alongamento (ν) e flexão (δ) de grupos característicos dos minerais de argila aparecem. Atualmente, técnicas de reflexão tais como a refletância difusa por transformada de Fourier são também muito utilizadas para resolver problemas específicos para os quais a transmitância não fornece uma solução adequada^{78,79}

Condições de análise

Os ensaios foram realizados, usando um espectrofotómetro de Infravermelhos com transformada de Fourier da Nicolet 6700 FT IR, equipado com software de aquisição de dados OMNIC 7.2. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente, na região de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, com uma resolução de 4 cm^{-1} e fazendo uma acumulação de 246 varrimentos. Todos os ensaios realizados usaram o KBr como material de referência. As amostras foram analisadas em pó, numa proporção de 1:6 (material:KBr).

IV.2.3 – TG-DSC

Os ensaios de termogravimetria (TG, do inglês thermogravimetry) e calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês Differential Scanning Calorimetry) podem ser úteis tanto para identificação de fases, como para a sua quantificação.

Na TG, monitoriza-se a massa da amostra durante o seu aquecimento rigorosamente controlado, por intermédio de uma microbalança de precisão, que regista e quantifica qualquer perda ou ganho de massa. Na DSC são obtidas as diferenças na energia transferida para a amostra e para a célula de referência por forma a manter ambas (amostra e referência) à mesma temperatura.

Condições de análise

Os ensaios foram realizados, usando um equipamento Setaram (TG-DSC 111) com uma precisão de 0,001 g e 0,05 mW, entre 25 a 600 °C, sob fluxo de oxigénio.

IV.2.5 – DLS

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica não invasiva e bem estabelecida de medição do tamanho e da distribuição do tamanho de moléculas e partículas, normalmente na região dos submicrométricos e com a tecnologia mais recente, menores do que 1 nm. O movimento das partículas em suspensão faz com que a luz que vem do laser seja dispersa com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, pela análise da modulação da intensidade da luz difundida como função do tempo, o tamanho de partícula pode ser determinado usando a relação Stokes-Einstein.⁸⁰

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Onde $d(H)$ é o diâmetro hidrodinâmico, D é o coeficiente de difusão translacional, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade.

É importante salientar que o diâmetro que é medido pelo DLS é um valor que se refere ao modo como uma partícula se difunde dentro um fluido, sendo assim referido como sendo um diâmetro hidrodinâmico. O diâmetro que é obtido por esta técnica é o diâmetro de uma esfera que tem o mesmo coeficiente de difusão de translacional de uma partícula.

Condições de análise

Foi utilizado um Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments, para medir o diâmetro hidrodinâmico ($d(H)$). Para a medição do $d(H)$, a amostra ($0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) foi agitada durante 5 minutos num banho de ultra-sons.

IV.2.4 – Adsorção de N₂ a -196 °C

Adsorção de gases ou vapores

A adsorção é um processo espontâneo que ocorre sempre que a superfície de um sólido é exposta a um gás ou vapor, sendo um dos métodos mais utilizados na caracterização de materiais adsorventes, isto é, com elevada capacidade de adsorção. Qualquer superfície adsorve fisicamente, neste tipo de adsorção a interação entre as moléculas do meio e do sólido é fraca, com ligações do tipo intermoleculares, baseadas em forças de Van der Wals. Este tipo de adsorção não é específico, é um processo rápido podendo prolongar-se por várias camadas e pode ser irreversível. O mesmo não acontece com a adsorção química, que é seletiva, estabelecendo-se ligações covalentes o que a torna um processo lento pois necessita de uma energia de ativação, encontrando-se limitado a uma monocamada.⁸¹

Muitos adsorventes de elevada área superficial são porosos, tornando-se útil muitas vezes distinguir entre a superfície externa e interna. Considera-se a superfície externa aquela que envolve as partículas discretas ou aglomerados, sendo no entanto difícil de a definir precisamente, pois as superfícies sólidas raramente são isentas de irregularidades à escala atômica. Define-se superfície externa a que inclui todas as proeminências e também a superfície das fendas que são mais largas do que profundas; A superfície interna compreende então as paredes de todas as fissuras, poros e cavidades que são mais profundas do que largas e que sejam acessíveis ao adsorvível.⁵¹ Na prática, demarcação dependerá dos métodos de avaliação e a natureza da distribuição de tamanho dos poros. Visto que a acessibilidade dos poros pode depender do tamanho e da forma das moléculas de gás, a área e o volume contido pela superfície interna, determinados por adsorção de gases podem depender das dimensões das moléculas que se adsorvem.

No contexto da adsorção física, é conveniente classificar os poros de acordo com as dimensões das respetivas aberturas⁵¹:

- (a) poros com larguras superiores a 50 nm são designados de macroporos
- (b) poros com larguras entre 2 nm e 50 nm, são designados de mesoporos;
- (c) poros com larguras não superiores a 2 nm são designados de microporos.

Estes limites são, em certa medida, arbitrários visto que os mecanismos de preenchimento dos poros dependem da sua forma e são influenciados pelas propriedades do adsorvível e pelas interações adsorvente-adsorvato.

De entre as propriedades da superfície, a área específica é um parâmetro importante uma vez que fornece a capacidade quantitativa da área disponível. No caso das argilas, a técnica mais usada na determinação da sua área específica aparente baseia-se na adsorção de gases, nomeadamente de azoto (N_2) a $-196^\circ C$. As isotérmicas de adsorção, que descrevem a quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa (p/p^0), podem apresentar diferentes formas dependendo do tamanho das partículas, da organização dos poros e das propriedades de superfície dos minerais. As isotérmicas de adsorção podem ser classificadas em seis tipos, tal como mostra a figura mostrados na Figura 2.

Isotérmicas de Adsorção e sua classificação

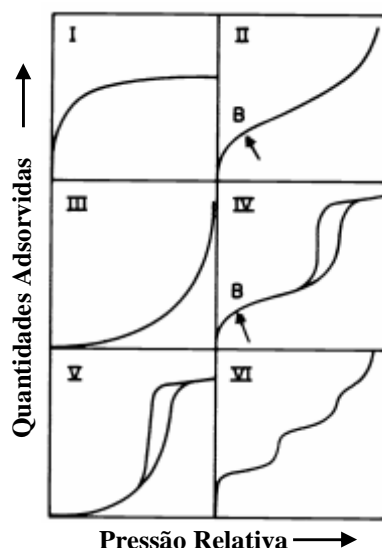


Figura IV. 2 - Tipos de isotérmicas de adsorção.⁵¹

As isotérmicas do Tipo I são côncavas relativamente ao eixo das pressões relativas, p/p^0 , tendendo para um limite à medida que p/p^0 tende para 1. Este tipo de isotérmicas são características de sólidos microporosos.

As isotérmicas do Tipo II apresentam um ponto de inflexão e são características de materiais não porosos ou que apresentem só macroporos. Estas isotérmicas traduzem mecanismos de preenchimento em monocamada-multicamada, sem restrições. O ponto B, no início da seção quase linear da isotérmica, é muitas vezes utilizado para indicar o preenchimento da monocamada e o início da formação das multicamadas.

As isotérmicas do Tipo III são convexas em relação a todo o eixo das pressões. Este tipo de isotérmicas não é muito comum, correspondendo a um mecanismo de adsorção em

que interações gás-sólido são muito fracas, aumentando as interações uma vez adsorvidas as primeiras moléculas. Não apresentam um ponto de inflexão, pois o preenchimento multicamada começa ainda antes de a monocamada estar totalmente preenchida.

As isotérmicas do Tipo IV são características pelo seu ciclo de histerese, associado à condensação capilar nos mesoporos. A parte inicial destas isotérmicas é semelhante às do Tipo II possuindo também um patamar na zona das pressões relativas mais elevadas.

As isotérmicas do Tipo V são obtidas em alguns materiais mesoporosos, nos quais as interações gás-sólido são fracas, tal como no caso das do Tipo III.

As isotérmicas do Tipo VI, representam a adsorção em multicamada por patamares que se observa em alguns sólidos não porosos cuja superfície é muito homogênea. Cada patamar representando a adsorção completa de uma camada.

Os materiais de base argilosa apresentam geralmente isotérmicas de adsorção de tipos mistos I + II ou I + IV. Na região das baixas pressões ($0 \leq p/p^0 \leq 0,2$, aproximadamente) a adsorção ocorre na superfície externa das partículas e nos microporos, caso existam. Para pressões relativas mais elevadas ($0,4 \leq p/p^0 \leq 0,95$) ocorre adsorção na segunda ou terceira camadas acompanhada de condensação nos mesoporos. Finalmente, para pressões relativas $> 0,95$, ocorre condensação nos macroporos.⁸²

Para caracterizar materiais adsorventes através das suas isotérmicas de adsorção torna-se necessário a utilização de modelos, por forma a analisar os dados experimentais. O modelo BET é o mais comum, foi proposto por Brunauer, Emmet e Teller (BET) em 1938 tendo sido aperfeiçoado para a adsorção em multicamadas, de sólidos não porosos, baseando-se na adsorção física. Deste modo, a sua aplicação a isotérmicas de sólidos porosos, especificamente sólidos microporosos, deve ser encarada com reservas. Esta é uma das razões pela qual se aconselha a designação de “ área específica aparente” aquando a aplicação deste modelo em sólidos microporosos.⁸¹⁻⁸³ Pela equação linearizada do método (Equação IV.1) é possível determinar a quantidade adsorvida na monocamada (n_m^a).

$$\frac{p/p^0}{n^a(1-p/p^0)} = \frac{1}{n_m^a \times c} + \frac{c-1}{n_m^a \times c} \times p/p^0 \quad \text{Equação IV. 1}$$

Na equação IV.1, p e p^0 são, a pressão de equilíbrio e a pressão de saturação à temperatura de adsorção, respectivamente, n^a é a quantidade adsorvida à pressão p , n_m^a a quantidade adsorvida na monocamada e c é um parâmetro que permite uma estimativa do calor de adsorção.

No caso de materiais microporosos, a área específica obtida pelo método BET é uma combinação da adsorção superficial e da condensação nos microporos. Usa-se, assim, um método diferente, que permite a obtenção da área superficial e do volume de microporos, com base na comparação da isotérmica de adsorção experimental com a isotérmica de referência obtida numa amostra não-porosa. No caso da adsorção de N_2 , o mais vulgarmente utilizado é o *método-t*.⁸²

Informações sobre mesoporosidade também podem ser obtidas a partir das isotérmicas de adsorção na gama das médias e altas pressões relativas. Vários métodos têm sido desenvolvidos para descrever simultaneamente a adsorção em multicamada e a condensação capilar. O mais comum é o *método BJH* proposto por Barret et al. (1951).⁸² Mais recentemente, Seaton et al. (1989) propôs o modelo DFT (do inglês *Density Functional Theory*) para calcular a distribuição do tamanho de poro a partir de isotérmicas de adsorção. Este método fornece uma abordagem mais fundamentada e versátil para o cálculo dos parâmetros da estrutura dos poros, em comparação com os métodos convencionais com base na equação de Kelvin.^{81, 84}

Condições de análise

As isotérmicas de adsorção de azoto (Air Liquid, 99,999 %) foram medidas num aparelho volumétrico automático, Figura IV. 3, (Micromeritics ASAP 2010) a -196 °C, usando um banho termostático de azoto líquido.

As amostras, cerca de 50 mg, foram desgaseificadas durante 2 horas a uma pressão inferior a 0,133 Pa e a uma temperatura de 300 °C.



Figura IV. 3 - Instrumentação para determinação das isotérmicas de adsorção de N_2 a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV.2.5 Espectroscopia de Absorção Atômica

A espectroscopia de absorção atômica (EAA) é uma técnica com uma sensibilidade extremamente alta. A amostra é atomizada na chama, através da qual passa radiação com comprimento de onda adequado a cada elemento a analisar (fonte – lâmpada de cátodo oco). A quantidade de radiação absorvida é uma medida quantitativa da concentração do elemento a ser analisado.

A amostra é lançada na chama que atinge temperaturas entre os $2100\text{--}2300\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante a combustão, os átomos da amostra são reduzidos ao estado atômico. Um feixe de radiação é emitido por uma lâmpada cujo cátodo é feito do elemento a ser determinado. A radiação após atravessar a chama passa por um monocromador e atinge o detetor. Os átomos livres no estado fundamental absorvem radiação a comprimentos de onda característicos de cada elemento. A redução da energia da radiação no comprimento de onda característico do analito é uma medida da quantidade desse elemento na amostra.

Condições de análise

Foram analisadas amostras das argilas sintéticas, de modo a determinar o teor de cobalto presente. Para cada amostra pesaram-se rigorosamente 20 mg, adicionaram-se 3 mL de ácido fluorídrico e 2 mL de água régia e colocou-se num autoclave que ficou numa estufa durante 2 h a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uma vez arrefecido o autoclave, adicionaram-se 2 g de ácido bórico sob agitação. Por fim, filtrou-se a amostra e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL perfazendo o volume com água milipore.

As amostras foram analisadas num espectrofotómetro de absorção atómica da Unicam 929 (ATI UNICAM) - Figura IV. 4, usando uma lâmpada de cobalto.



Figura IV. 4 - Espectrofotómetro de Absorção Atómica.

IV.2.5 Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica é uma técnica muito importante para a investigação de argilas, uma vez que a maioria dos minerais de argila aparece como minúsculas partículas na escala nanométrica e micrométrica.

A MEV emprega um feixe de eletrões que colidem com a superfície da amostra, previamente metalizada, gerando eletrões secundários. É a partir destes eletrões que se obtém uma imagem. O feixe de eletrões primário é móvel e varre a superfície da amostra, daí obtém-se uma imagem completa da superfície da amostra a observar. Hoje em dia, a MEV permite observar agregados de argilas inferiores a 1000 nm, o seu poder de resolução é da ordem do 10 nm e pode atingir ampliações de 20000 \times .⁸⁵

Condições de análise

Foram analisadas por MEV algumas argilas sintéticas. Previamente à observação em MEV procedeu-se ao recobrimento da amostra, depositada num porta-amostras, com uma fina camada de ouro usando um Jeol JFC-1200 Fine Coater (Figura IV. 5, esquerda).

As amostras foram então analisadas num microscópio eletrónico de varrimento da JEOL JSM-5200LV (Figura IV. 5, direita), usando um feixe de 25kV. Foram usadas ampliações entre 500 a 10000 \times .



Figura IV. 5 – Instrumentação para recobrimento a ouro (esquerda) e microscópio eletrônico de varrimento (direita).

IV.3 – Estudos de Adsorção/Libertação de Óxido nítrico

Os estudos de adsorção e libertação de óxido nítrico (NO) foram realizados em todas as amostras, tanto em fase gasosa como posteriormente em fase líquida.

Adsorção/Libertação de NO em fase gasosa

Os perfis cinéticos de adsorção de NO nos materiais adsorventes foram determinados numa microbalança (C. I. Electronics, Disbal) adequada para vácuo ligada a um sistema de bomba de alto vácuo composto por uma bomba turbomolecular e uma bomba de diafragma (Pfeiffer Vacuum). As amostras, com uma massa e cerca de 6 mg, foram desgaseificadas num vácuo melhor que 10^{-2} Pa, durante 2 h, usando a mesma temperatura que nos ensaios de adsorção de azoto, 300 °C.

Uma vez o sistema arrefecido, foi introduzido NO na linha até uma pressão de 80 kPa. A balança, que se encontra ligada a um computador foi registando o aumento de massa em intervalos de 2 pontos por minuto, até se ter atingido o equilíbrio ou durante 3 dias. As leituras de pressão foram feitas com um medidor capacitivo (Pfeiffer Vacuum, CMR 262). A temperatura foi controlada a 25 °C usando um banho de água termostatizado (Grant, GD120), com 0,05 °C de precisão. Uma vez atingido o equilíbrio, foi feito vácuo na célula durante 48 h, tendo sido registada, do mesmo modo, a perda de massa, ou seja, a libertação de óxido nítrico.



Figura IV. 6 - Instalação para ensaios de adsorção/libertação de NO em fase gasosa.

Libertação de NO em fase líquida

Os estudos de liberação de NO em fase líquida foram realizados seguindo o ensaio da oxi-hemoglobina (oxiHb), que se encontra detalhadamente descrito na literatura.⁸⁶

Nos ensaios com oxi-hemoglobina foram usados cerca de 4,5 mg de amostra. Para evitar o problema da dispersão na fase líquida, as amostras foram misturadas com poli(tetrafluoroetileno) (PTFE, com 25 mm de tamanho de partícula, Aldrich) na proporção de 75 % amostra: 25% PTFE. A mistura foi então prensada em discos (5 mm de diâmetro), sob 8 toneladas de pressão durante 30 s. Em seguida, pesaram-se 6 mg dos discos foram introduzidos em pequenos cadinhos de vidro e posteriormente, numa célula de vidro para vácuo com uma válvula de PTFE. A célula foi conectada a uma linha de vácuo e as amostras foram desgaseificadas em vácuo melhor que 10^{-2} Pa, durante 2 horas, a 300 °C. Após arrefecimento, o NO foi introduzido na célula, a válvula foi fechada e a amostra foi deixada em contacto com NO durante três dias - Figura IV. 7 a).

Após os três dias, a célula foi evacuada durante um minuto para remover o NO em fase gasosa e cheia com hélio até pressão à atmosférica. Para a liberação do NO, as amostras foram adicionadas a 3 mL de solução de oxiHb (1 μ M) numa cuvette de quartzo, a qual foi fechada e agitada. Foram obtidos espectros de UV-Vis, à temperatura ambiente, de 10 em 10 minutos durante 2 h, num espectrofotômetro de UV-Vis (Genesys 10s UV-Vis da Thermo Scientific - Figura IV. 7 b). À medida que o NO se vai libertando, reage com a oxiHb originando meta-hemoglobina (metHb). Os espectros registados ao longo do tempo representam os espectros absolutos de diferentes misturas de oxiHb e metHb.

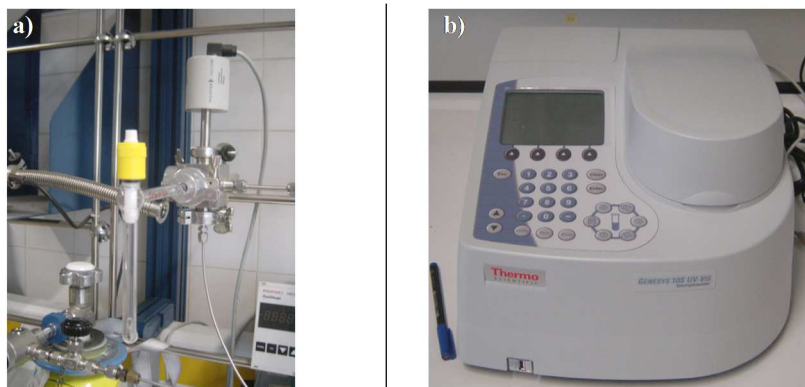


Figura IV. 7 - a) Sistema para adsorção de NO, preparação para a fase líquida; b) Espectrofotômetro de UV-Visível.

Método da oxi-hemoglobina⁸⁶

Como referido, o método da oxi-hemoglobina é muito específico para a determinação e quantificação de NO libertado, encontrando-se bem estabelecido na literatura.

Este método baseia-se na reação da oxiHb com o NO para formar a metHb. Na presença de oxigénio em solução aquosa, mesmo quantidades muito baixas, o NO é altamente instável, uma vez que é propenso a reações rápidas com oxigénio. Tal como é válido para qualquer método de quantificação de NO, a reação do detetor com o NO deve ser, idealmente, mais rápida do que as reações competitivas. Para o ensaio da oxi-hemoglobina, este pré requisito é satisfeito pela elevada velocidade de reação entre o NO e a oxiHb, a qual se estimada ser, pelo menos, 26 vezes mais rápida, nas condições do ensaio, do que a auto-oxidação do NO em solução aquosa (mesmo em concentrações de saturação do oxigénio).⁸⁶

A vantagem da reação rápida entre NO e a oxiHb é óbvia: a captura de NO pela oxiHb será quase estequiométrica. Assim, o ensaio da oxiHb apresenta características únicas entre os métodos para a determinação de NO, uma vez que é menos sujeito a restrições impostas pela reação com o oxigénio ou outras reações competitivas.

Preparação da oxi-hemoglobina⁸⁶

A solução de oxi-hemoglobina foi preparada dissolvendo, mediante agitação suave, 20 mg de hemoglobina humana liofilizada, (Hb) (Sigma-Aldrich) em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4). De seguida foi adicionado ditionito de sódio, 2-3 vezes em excesso relativamente ao grupo heme, de modo a assegurar a completa redução da hemoglobina. Ao

adicionar-se o agente redutor a solução mudou de cor, passando de um acastanhado (mistura de metHb e oxiHb) para um vermelho escuro. A mistura foi então oxigenada durante alguns minutos, mudando a cor para vermelho vivo, indicativo da oxigenação da hemoglobina

A purificação e dessalinização foram realizadas fazendo passar a solução resultante através de uma coluna de Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich). A coluna de Sephadex foi preparada previamente, com um volume dez vezes superior ao da solução de oxiHb e eluída com cinco vezes o volume da coluna. Da solução purificada foram retirados 20 μL e adicionados a 2,98 mL de tampão fosfato, de modo a se obter uma concentração final de oxiHb de 1 μM .

O espectro absoluto da oxiHb⁸⁶ caracteriza-se por uma intensa banda de absorção com um máximo a 415 nm, banda γ , ($\epsilon_{415} = 131 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e dois máximos de absorção mais fracos a 542 nm e 577 nm, bandas β e α respetivamente, ($\epsilon_{542} = 14,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{577} = 15,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As bandas espectrais características da metHb são semelhantes às da oxiHb, no entanto, a banda γ tem o seu máximo de absorção em 406 nm ($\epsilon_{406} = 162 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As bandas β e α só são detetadas em meio alcalino a 575 e 540 nm, respetivamente. Em meio neutro ou ácido observam-se bandas a 630 nm e 500 nm, respetivamente ($\epsilon_{630} = 3,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{500} = 9,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para determinar a cinética de libertação de NO, que corresponde à formação de metHb pode recorrer-se à diferença entre dois comprimentos de onda: o comprimento de onda onde a diferença de absorvância entre a oxiHb e a metHb é maior e o comprimento de onda de um posto isosbético, no qual a absorvância não varia. No ensaio da oxi-hemoglobina o par de comprimentos de onda mais vantajoso é a combinação 401/410,5 nm.

Durante a conversão de oxiHB a metHb, a absorvância ao comprimento de onda 410,5 nm mantém-se constante ao passo que a absorvância ao comprimento de onda 401 nm vai aumentando gradualmente. Deste modo, aumenta também a diferença de absorvância entre os dois comprimentos de onda, $\Delta(\Delta A_{401-410,5})$.

Por forma a calcular-se o aumento da concentração da metHb formada ao longo do tempo (Δc_{metHb}) divide-se a diferença $\Delta(\Delta A_{401-410,5})$ pelo valor do coeficiente de extinção molar para esta reação ($\epsilon_{401-410,5 \text{ metHb-oxHb}}$). A curva de $\Delta(\Delta A_{401-410,5})$ em função do tempo dá-nos o valor da concentração de metHb, a qual é idêntica à concentração de NO libertado, no mesmo período de tempo.

IV.4 – Ensaios Toxicológicos

Visto o objetivo deste trabalho ser a utilização dos materiais como suporte de NO para fins terapêuticos, considerou-se ser importante estudar a respetiva toxicidade em células humanas.

Assim, selecionaram-se alguns materiais, que apresentaram melhores resultados a nível de adsorção/libertação de NO, para serem testados em células HeLa (American Type Culture Collection, Manassas VA, USA). Todo o manuseamento das células foi feito dentro de uma câmara de fluxo laminar, com material estéril, de modo a minimizar todo o risco de contaminação (Figura IV. 8).



Figura IV. 8 - Câmara de fluxo laminar. 1 – PBS, 2 – Tripsina, 3 – Meio de cultura, 4 – placa de cultura.

IV.4.1 – Cultura Celular

Descongelamento das células

O descongelamento das células ocorre de forma muito rápida. Retira-se do reservatório de azoto líquido o *ependorf* que contém as células e descongela-se em água a 37 °C, adicionando-se se seguida a uma placa de cultura contendo 9 mL de meio. Foi utilizado um meio RPMI-1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, o inglês Fetal Bovine Serum), 2 mM de Glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina, todos os reagentes da HyClone. As células foram mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de dióxido de carbono sendo passadas sempre que se encontrassem confluentes.

Passagem das células

O procedimento de “passagem das células” envolve um conjunto de passos que se descrevem seguidamente. As células são retiradas da estufa e, após remoção do meio, lavadas duas vezes com cerca de 4 mL de PBS. De seguida são novamente incubadas a 37 °C com 2 mL de tripsina entre 2 a 3 minutos. Após se verificar que as células estão soltas, dilui-se a tripsina com o dobro do volume de meio e centrifugam-se a 42 g durante 5 minutos, de modo a que estas se separem do meio. Após remoção do sobrenadante, ressuspendem-se as células com meio novo entre 3 a 6 mL (dependendo do tipo de diluição que se quer fazer). Finalmente, 1 mL de células são novamente passadas para uma placa de cultura, contendo 9 mL de meio novo, e colocadas a incubar.

Plaqueamento das células

No processo de passagem das células, e após ressuspensão, são inseridos 10 µL de células em cada uma das câmaras do hemacitómetro e as células são contadas. Sabendo o número de células/mL é possível preparar uma solução de modo a poder plaquear cada poço de uma microplaca com o número de células pretendidas. Dependendo dos ensaios a efetuar, o número de células e o volume total a usar pode variar, como será descrito mais à frente ainda nesta secção.

IV.4.2 – Ensaios de fluorescência com Alamar Blue

Como referido anteriormente, foram realizados ensaios para testar a toxicidade de alguns dos materiais preparados. Nestes ensaios foram plaqueadas 7500 e 2500 células/poço (para ensaios às 24 e 72 h, respetivamente) em microplacas de 96 poços, com um volume por poço de 100 µL. Após 24 h de incubação foram adicionados 10 µL de suspensão das amostras, obtendo-se uma concentração final de amostra de 450 µg/mL. No dia do ensaio, o meio foi substituído por meio novo e foram adicionados 10 µL de AlamarBlue. O Alamar Blue reage com as células vivas reduzindo-se, originando um composto rosa que emite fluorescência.⁸⁷ Passadas aproximadamente 4h fizeram-se leituras de fluorescência, tendo sido efetuadas 9 leituras em cada poço. Previamente, o Alamar Blue foi testado com as amostras, sem células, no sentido de ver se estas reagem com o Alamar.

O mesmo ensaio foi efetuado para 24h de exposição das células às amostras, fazendo variar a concentração das amostras entre 112 e 1800 $\mu\text{g/mL}$.

IV.4.3 – Ensaio de “scratch”

O ensaio de “scratch”, é uma metodologia de relativamente fácil execução e de baixo custo sendo um método de estudo bem desenvolvido para medir a migração de células *in vitro*. Os passos básicos envolvem a criação de um corte na monocamada celular. Imagens são então capturadas no início e em intervalos regulares durante a migração celular para fechar o “scratch”. Por comparação das imagens é possível quantificar a taxa de migração das células. Em comparação com outros métodos, o ensaio de “scratch” é particularmente adequado para estudos sobre os efeitos de células-matriz e interações célula-célula na migração celular durante a cicatrização de feridas *in vivo*.⁸⁸

Condições de Ensaio

Numa placa de cultura de 24 poços, foram adicionadas 38000 células / poço num volume total de 500 μL . Após um período de incubação de 48 h, o “scratch” foi feito com a ponta de uma micropipeta P200, para simular uma ferida. Removeu-se o meio, com os restos celulares, e foi adicionado novo meio.

Foram então adicionados 10 μL de suspensão das amostras selecionadas com e sem NO, obtendo-se uma concentração final de amostra de 450 $\mu\text{g/mL}$. As células sem amostra foram usadas como controlo. O “scratch” foi observado com um microscópio Olympus CK40 (ampliação de 10×10), tendo sido capturadas imagens digitais das com uma câmara digital (Olympus, Cemédia C-4040zoom) após a adição das amostras ($t = 0$) e de 2 em 2 h até $t = 8$ h, finalizando com a captura de fotos a $t = 72$ h. Cada poço foi marcado abaixo da superfície da placa, traçando linhas horizontais, para permitir a identificação da mesma área cortada, a fim de tirar fotografias consistentes. Área do corte foi medida utilizando o software ImageJ 1.44o (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

IV.5 – Ensaio Eletroquímicos

O desenvolvimento da investigação relacionada com o NO é bastante complexo visto este composto ter um tempo de meia vida reduzido (entre 2 a 30 segundos sendo de 4

segundos em soluções biológicas) e ter uma elevada reatividade com outros compostos biológicos como foi já referido.¹⁸ A concentração de NO pode, em princípio, ser quantificada recorrendo a elétrodos seletivos que possuem capacidade de monitorizar a sua concentração *in situ*, *in vivo* e em tempo real, com elevada resolução temporal e espacial.^{18, 89}

Calibração do elétrodo

A libertação de óxido nítrico foi medida com um elétrodo seletivo de NO (ISO-NOP da World Precision Instruments, WPI) - Figura IV. 9 O elétrodo (que se encontra numa câmara fechada – Figura IV. 10) foi previamente polarizado, mergulhando-o numa solução de KI/H₂SO₄ 0,1 M, durante anoite. Posteriormente o elétrodo foi calibrado de acordo com as indicações do fabricante (World Precision Instruments, WPI), segundo as quais se adicionam alíquotas de uma solução de nitrito (5, 10, 20 µL) de 50 µmol L⁻¹ (solução diluída a partir da solução de referência do fabricante, NaNO₂ 0,01 M), a 2 mL de solução KI/H₂SO₄ 0,1 M com agitação magnética, previamente desarejada.

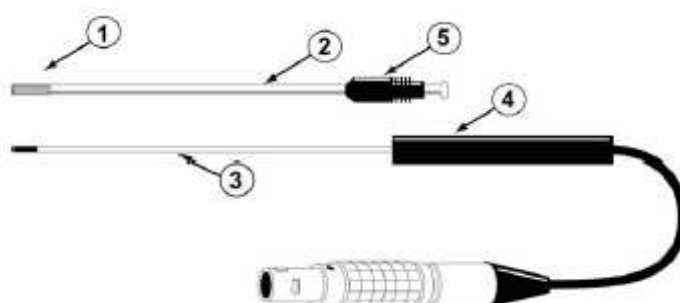


Figura IV. 9 – Esquema do elétrodo de NO. 1 – Membrana polimérica permeável ao NO, 2 – Manga protetora de aço inoxidável descartável que acomoda o par de elétrodos, 3 – par de elétrodos, de trabalho e referência, 4 – suporte da sonda, 5 – tampa que prende a manga protetora da sonda.

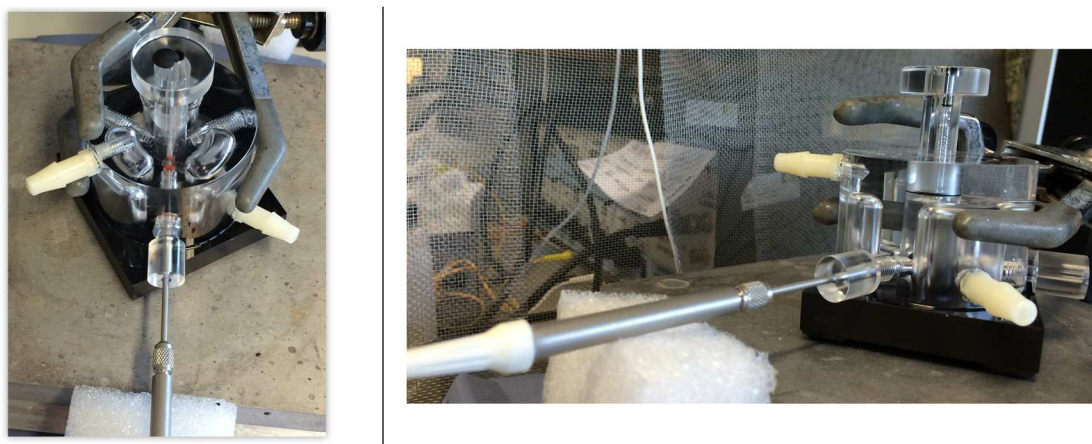
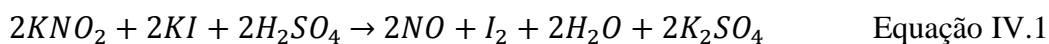


Figura IV. 10 - Eléctrodo medidor de NO.

Nestas condições é produzido NO (Equação IV.1), que se difunde pela membrana seletiva até à superfície do eléctrodo onde é oxidado gerando uma corrente que é proporcional à quantidade de NO em solução. O sinal de corrente é acompanhado por um programa de software (DataTrax2) no computador. Após a adição de cada alíquota a corrente sobe rapidamente voltando a atingir o equilíbrio, devendo então adicionar-se a alíquota seguinte.



A curva de variação da corrente com a adição de cada alíquota será semelhante à da Figura IV. 11 a). A partir destes resultados pode construir-se a curva de calibração - Figura IV. 11 b).

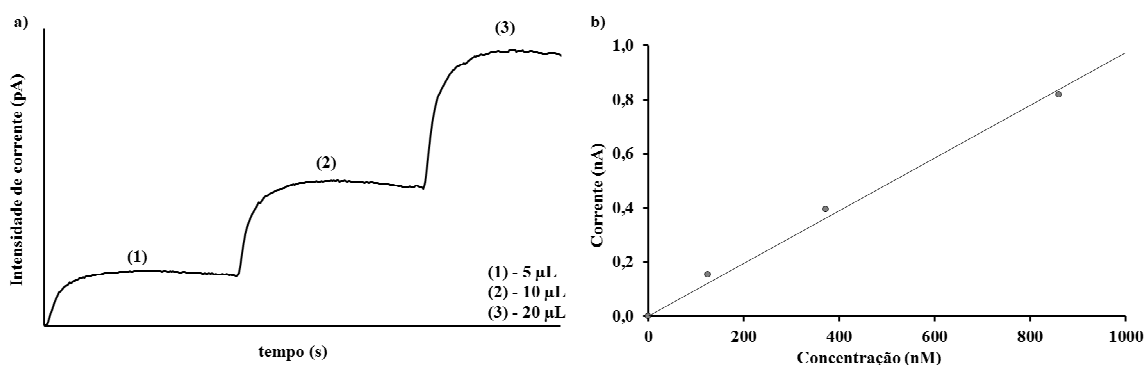


Figura IV. 11 – a)Variação do sinal da corrente após adição das alíquotas de nitrito, b)Curva de calibração.

Condições de análise

O procedimento para preparação das amostras foi idêntico ao utilizado para determinação de NO em solução de oxiHb, como descrito na secção IV.3. No entanto, para estes ensaios foram pesados 4,5 mg de pó. Começou por se adicionar 2 mL de solução KI/H₂SO₄ 0,1 M, desarejada durante 10 minutos, à câmara onde se encontra o eletrodo, com agitação mecânica. Após formação da linha de base, o pó foi adicionado à solução (tapando a câmara) e foi medido o sinal de corrente. Atingido o patamar de equilíbrio, recorrendo à curva de calibração determinou-se o teor de NO libertado pela amostra.

Capítulo V

Resultados e Discussão

V.I – Materiais a partir da Montmorilonite

V.I.1 – Caracterização dos materiais

Como referido anteriormente, sintetizaram-se várias PILCs a partir de uma argila natural do tipo Montmorilonite. Sintetizaram-se PILCs por introdução de pilares de óxido de alumínio (Al-P), pilares mistos de óxido de alumínio e óxido cobalto (CoAl-P), e pilares de óxido de titânio a partir do cloreto e do etóxido de titânio (Ti(Cl)-P e Ti(Et)-P, respetivamente). A amostra Ti(Cl)-P foi ainda impregnada com iões cobalto, por via húmida e seca (obtendo-se as amostras wCoTi(Cl)-P e dCoTi(Cl)-P, respetivamente) - Secção IV.I.1. Todas as amostras foram caracterizadas por TG-DSC, DRX e isotérmicas de adsorção de azoto.

Foram realizados ensaios de TG-DSC em todas as amostras não calcinadas - Figura V.I. 1. A maior perda de massa ocorreu entre os 50 e 125 °C para todas as amostras, cerca de 15 %, exceto para a Ti(Cl)-P e dCoTi(Cl)-P que perderam menos massa, cerca de 10 %. Esta perda inicial de massa corresponde à perda de água que está fisicamente adsorvida. Após esta perda inicial, a MMT mantém a sua massa aproximadamente constante até aos 600 °C. Nas PILCs que contêm pilares de óxido de alumínio - Figura V.I. 1 a), observa-se ainda um novo patamar de perda de massa que ocorre entre os 250 a 300 °C, à qual está associado um pico endotérmico na curva de fluxo de calor - Figura V.I. 1 b). Este pico foi já atribuído anteriormente à transformação das espécies oligoméricas intercaladas nos seus respetivos óxidos, dando origem à formação dos pilares.⁶⁰ As reações endotérmicas a partir dos 450 °C, aproximadamente, confirmadas pela perda de massa, devem-se à desidroxilação (aproximadamente 10 % de perda de massa). Os resultados TG-DSC para as argilas com titânio apresentam essencialmente a desidratação das amostras, da água fisicamente adsorvida e a partir dos 450 °C as mesmas reações de desidroxilação, cerca de 15 % de perda de massa. Nestas argilas não é tão notória a formação dos pilares correspondentes, embora por volta 200 °C se observe uma ligeira alteração endotérmica na curva do fluxo de calor.

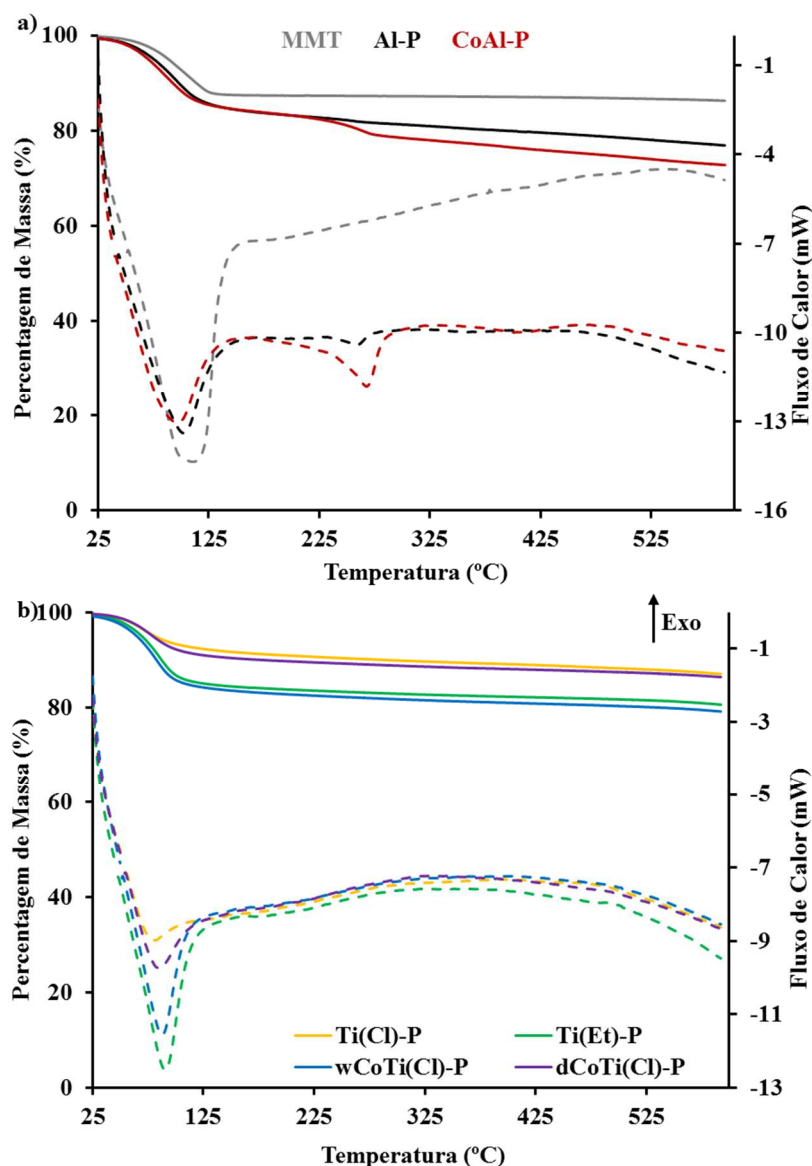


Figura V.I. 1 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas): a) argila de partida e PILCs de alumínio, b) PILCs com titânio.

Para confirmar a formação de pilares, após calcinação das amostras, obtiveram-se os espectros de difração de raios X - Figura V.I. 2 – para a argila de partida e para as PILCs derivadas desta. A MMT apresenta um pico estreito e bastante intenso na proximidade dos 7° de 2θ que corresponde a um espaçamento basal característico, d_{001} , de 12 \AA .⁹⁰ Os picos para valores próximos de $20, 22, 27$ e 35° de 2θ podem também ser identificados como sendo reflexões características da MMT.^{90,91} Nas amostras com pilares de óxido de alumínio ou óxidos de alumínio e cobalto, o pico correspondente ao espaçamento basal sofreu um desvio para ângulos mais baixos. Tanto na Al-P como na CoAl-P o espaçamento basal aumentou para cerca de 18 \AA - Tabela V.I. 1. Nas restantes PILCs o pico correspondente ao

espaçamento basal não é tão definido, provavelmente como consequência de uma estrutura mais desorganizada, quando comparadas com a Al-P e a CoAl-P. A cerca de 24 e 28 ° de 2 Θ observa-se a presença de picos apenas nas amostras contendo pilares de óxido de titânio, o que será indicativo da presença deste metal na estrutura da PILC. Outros picos de difração atribuíveis aos óxidos de titânio ocorrem para valores de 2 Θ de 28 e 35 °, no entanto estes encontram-se sobrepostos nas reflexões da argila de partida.⁹²

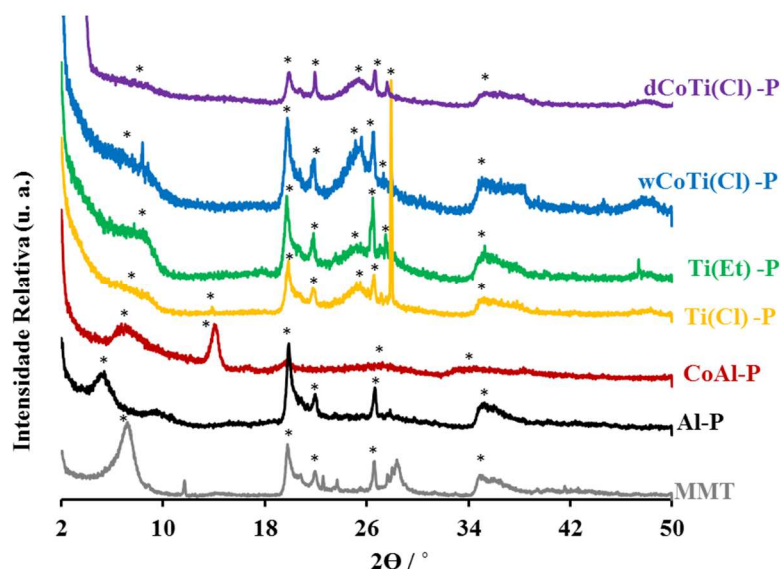


Figura V.I. 2 - Espectros de difração de raios X das PILCs obtidas a partir da Montmorilonite.* - Reflexões caraterísticas da Montmorilonite.⁹³

Tabela V.I. 1 - Parâmetros texturais, onde, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA e d_{001} é o espaçamento basal.

Material	A_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	V_{μ} ($cm^3 g^{-1}$)	V_m ($cm^3 g^{-1}$)	E_0 ($kJmol^{-1}$)	d_{001} (\AA)
MMT	20	---	0,03	---	12,60
Al-P	262	0,10	0,08	5,26	18,36
CoAl-P	155	0,05	0,10	4,90	17,80
Ti(Cl)-P	276	0,13	0,06	4,06	---
Ti(Et)-P	241	0,09	0,09	4,05	10,07
wCoTi(Cl)-P	265	0,13	0,07	4,19	10,54
dCoTi(Cl)-P	248	0,11	0,06	3,88	10,08

A Figura V.I. 3 mostra as isotérmicas de adsorção-desadsorção de azoto na MMT e argilas com pilares. A MMT apresenta uma isotérmica do tipo IIb, tal como seria de esperar

numa argila natural, as quais são materiais não porosos compostos por agregados de partículas lamelares. Nas argilas com pilares, a forma da isotérmica é semelhante entre si sendo uma combinação entre os tipos I e IIb.^{51, 81} A maior diferença reside na primeira parte da isotérmica, abaixo da pressão relativa $0,4 \ p/p^0$, correspondente à adsorção na microporosidade resultante do processo de formação de pilares.

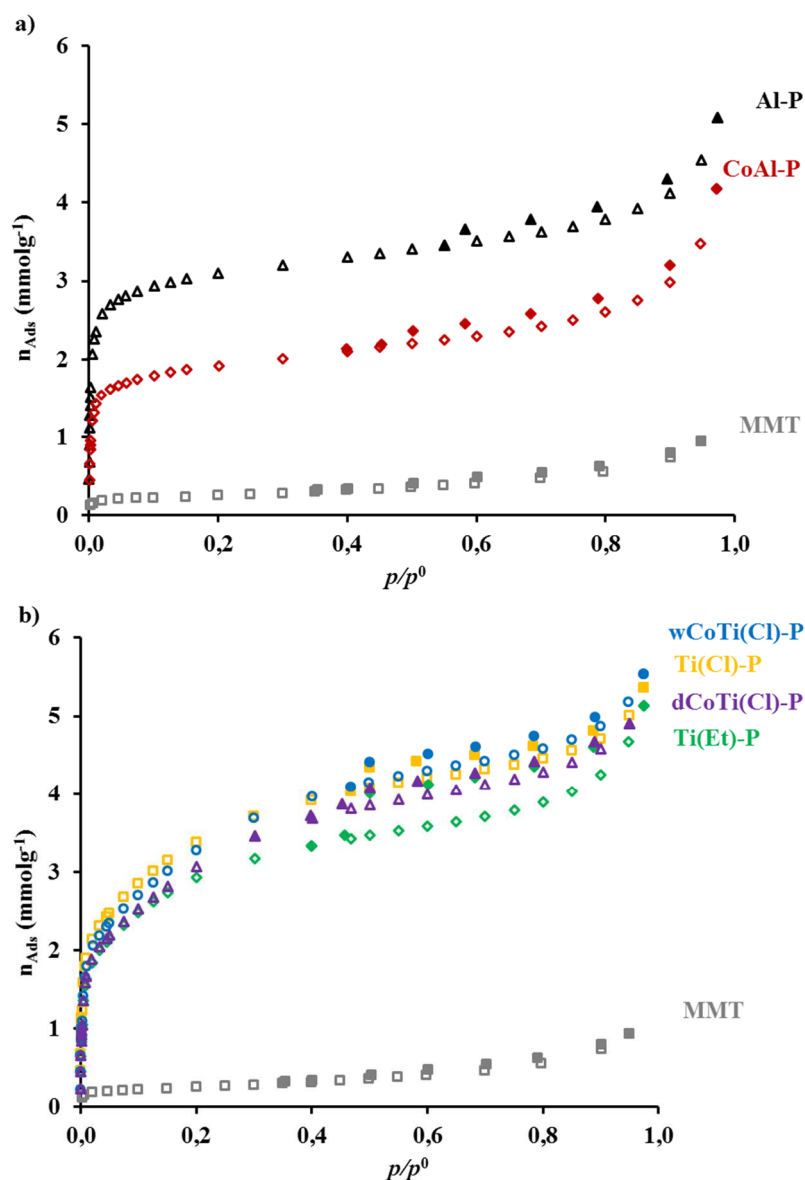


Figura V.I. 3 - Isotérmicas de adsorção de azoto a -196 °C .

As PILCs preparadas são materiais essencialmente microporosos. Os sólidos Al-P e a CoAl-P apresentam poros com aberturas de cerca de 1,5 nm. Embora as PILCs com óxido de titânio também apresentem maioritariamente poros com aberturas próximas de 1,5 nm, a

sua distribuição de tamanho de poros não é tão uniforme, apresentando poros com larguras superiores - Figura V.I. 4.

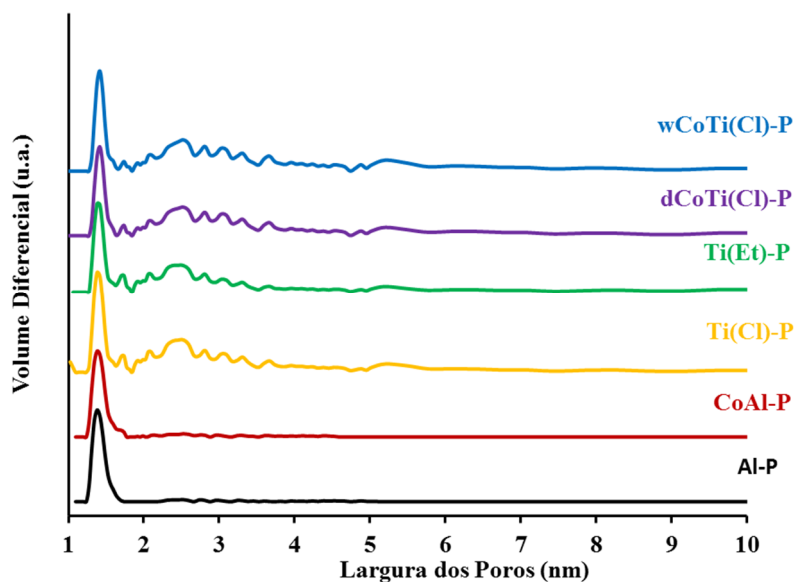


Figura V.I. 4 - Distribuição de tamanho de poros.

V.I.2 – Estudos de adsorção e de liberação de NO

V.I.2.1 – Fase gasosa

Os resultados da adsorção e liberação de óxido nítrico encontram-se na Figura V.I. 5 e Figura V.I. 6, respectivamente

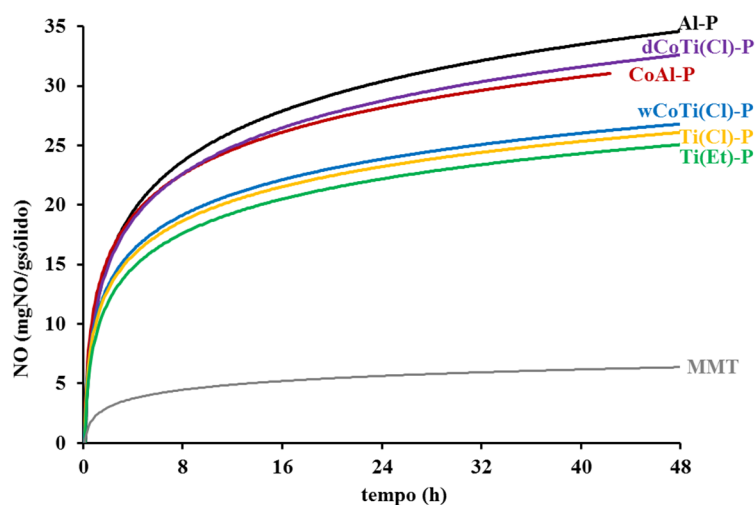


Figura V.I. 5 - Adsorção de NO em fase gasosa (a 25 °C).

Os materiais preparados adsorveram substancialmente mais NO que a Montmorilonite. Os teores de NO adsorvido encontram-se entre 2,7 e 3,5 %, em massa – ver Tabela V.I. 2. Tal como se pode observar na Figura V.I. 5, o tipo de pilares parece ter influência na adsorção de NO, parecendo existir dois grupos, pilares de óxido de alumínio e óxido de titânio. Considerando os materiais com pilares de óxido de alumínio, a introdução de pilares mistos com óxido de cobalto não levou nem ao aumento das quantidades de NO adsorvido nem melhorou a cinética de libertação, na fase gasosa – ver Figura V.I. 5 e Figura V.I. 6. As PILCs com pilares de óxido de alumínio foram as que adsorveram mais NO, aproximadamente 35 e 32 mg_{NO} / g_{sólido}, respetivamente para a Al-P e CoAl-P - Tabela V.I. 2. Nos primeiros minutos de libertação, as amostras com pilares de óxido de titânio, e embora o teor de NO armazenado não tenha sido superior em relação aos materiais com óxido de alumínio, apresentaram uma cinética de libertação mais favorável (ou seja, mais lenta) - Figura V.I. 6. Este tipo de resultados foi particularmente evidente na amostra Ti(Et)-P, preparada a partir do etóxido de titânio, que embora seja a que menos NO armazena é a que apresenta o perfil cinético inicial de libertação mais lento.

Tabela V.I. 2 - Adsorção e libertação de NO em fase gasosa.

Material	%NO _{Ads} ^a	NO _{Ads} ^b	NO _{Lib} ^c	NO _{Lib} ^d
MMT	0,7	7,2	2,10	2,80
Al-P	3,5	35,3	9,87	13,22
CoAl-P	3,2	31,6	8,92	12,20
Ti(Cl)-P	2,7	26,8	12,67	13,06
Ti(Et)-P	2,7	26,8	10,12	15,10
wCoTi(Cl)-P	2,8	27,5	10,68	12,40
dCoTi(Cl)-P	3,5	34,9	14,23	17,52

^a máximo de NO adsorvido na fase gasosa, ^b máximo de NO adsorvido na fase gasosa (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹), ^c NO libertado ao fim de 2h (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹) em fase gasosa, ^d NO libertado em fase gasosa ao fim de 20 h (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹).

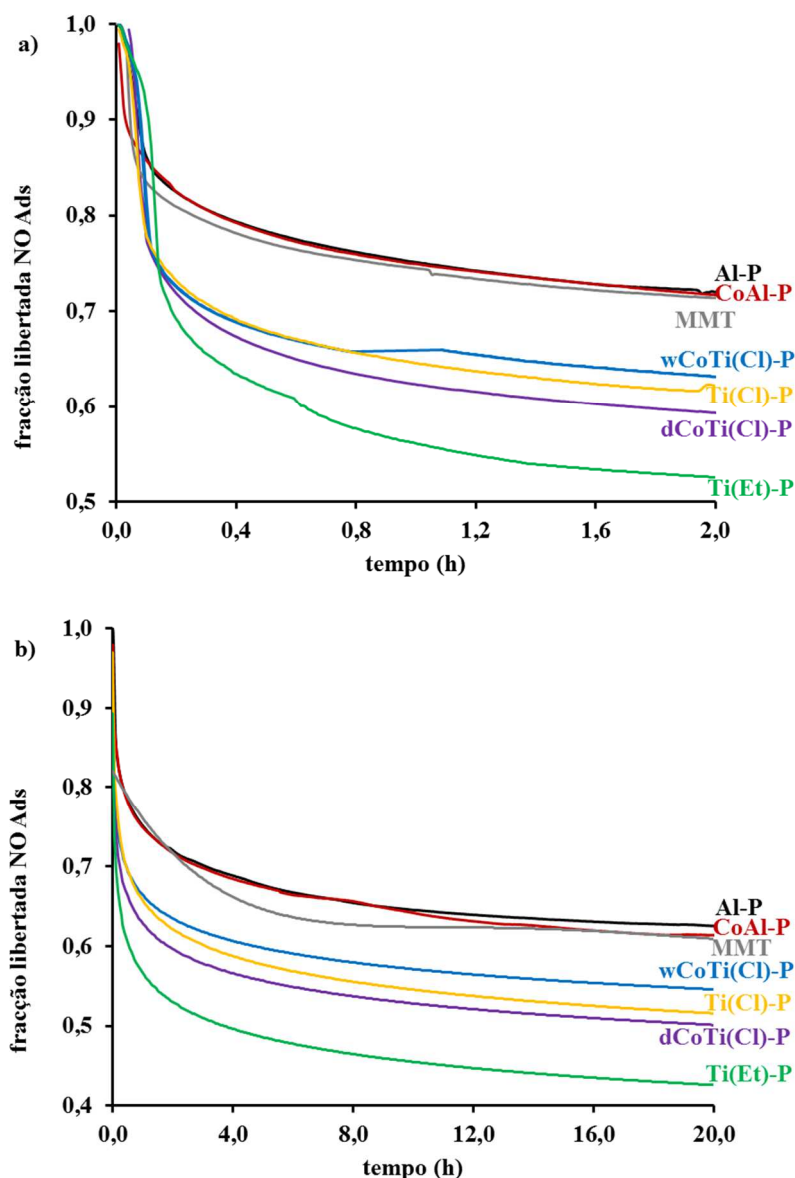


Figura V.I. 6 - Libertação de NO na fase gasosa (a 25 °C). a) ao fim de 2h; b) ao fim de 20 h.

Podem observar-se alguns efeitos da influência da natureza dos vários tipos de pilares expressando as quantidades de NO, adsorvido e libertado, pela unidade de superfície superficial (A_{BET} na Tabela V.I. 2). Os valores assim obtidos estão representados graficamente na Figura V.I. 7. As quantidades de NO libertado foram divididas em duas partes de acordo com o passo inicial de libertação de NO apresentado na Figura V.I. 6, tendo-se considerado o NO libertado nessa primeira fase como "rápido" e o restante como "lento". Como se pode observar na Figura V.I. 7 a CoAl-P é a que apresenta a maior quantidade de NO adsorvido por unidade de área seguido pela Al-P, o que sugere uma interação favorável do NO com os pilares de óxido de alumínio que se torna ainda mais evidente para os pilares mistos de óxido de alumínio / cobalto. É também evidente a partir da Figura V.I. 7, assim

como da Tabela V.I. 2, que existe uma elevada quantidade de NO que é irreversivelmente adsorvido na fase gasosa. Considerando-se a libertação para a Al-P e, particularmente, para a CoAl-P, a proporção de NO que é libertado inicialmente e de uma forma mais rápida é menor do que o NO que é libertado posteriormente e de uma forma mais lenta, ao passo que para o conjunto de materiais com óxido de titânio, ambas quantidades são relativamente semelhantes. Além disso, no caso dos materiais com pilares de óxido de titânio, a presença de pilares mistos com óxido de cobalto, melhoraram apenas ligeiramente os montantes totais de NO adsorvido, não tendo melhorado a quantidade de NO que é libertado na fase mais lenta.

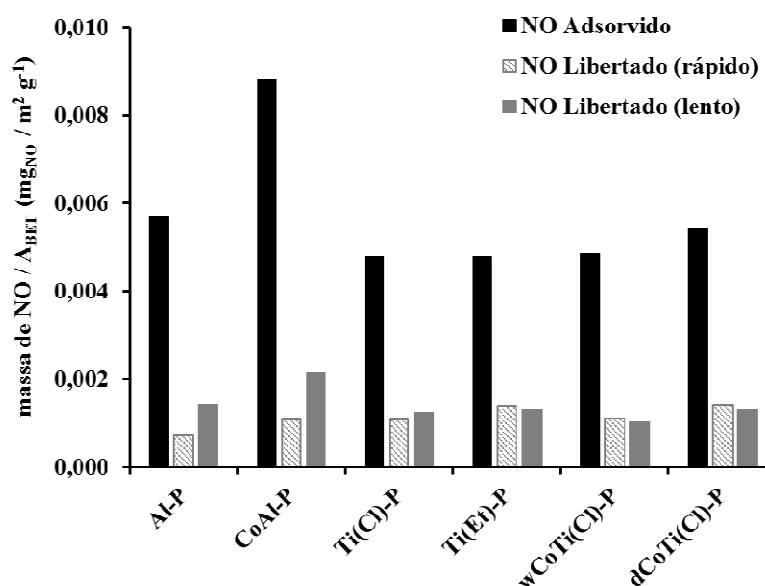


Figura V.I. 7 - Massa de NO adsorvida e libertada, expressa por unidade de área superficial; "rápido" corresponde ao NO libertado na fase inicial de libertação, e "lento" corresponde ao restante NO libertado até ao final do ensaio.

Numa tentativa de quantificar os resultados da cinética de libertação de NO acima apresentados, sobretudo numa perspetiva de compreender e relacionar a cinética com propriedades dos materiais, utilizaram-se alguns modelos que estão relacionados com a cinética de libertação de compostos com fins terapêuticos, como seguidamente se descreve. Com efeito, vários modelos matemáticos têm sido desenvolvidos no sentido de elucidar os mecanismos que controlam a libertação de fármacos e prever a cinética de libertação daí resultante.⁹⁴⁻⁹⁸ A descrição completa de um modelo cinético é difícil devido a vários fatores a ter em conta durante a libertação do fármaco.⁹⁷ Dos vários modelos existentes alguns têm

sido mais utilizados, nomeadamente os modelos de Higushi (Equação V.I.1) Korsmeyer-Peppas (Equação V.I.2) e Peppas-Sahlin (Equação V.I.3).^{94, 96, 99, 100}

$$\frac{M}{M_0} = kt^{1/2} \quad \text{Equação V.I. 1}$$

$$\frac{M}{M_0} = kt^n \quad \text{Equação V.I. 2}$$

$$\frac{M}{M_0} = k_d t^m + k_r t^{2m} \quad \text{Equação V.I. 3}$$

Nas equações acima, M/M_0 (onde M é a quantidade de NO libertado ao longo do tempo e M_0 é o teor total de NO libertado) corresponde à fração de NO libertada ao longo do tempo t , k é a constante cinética característica do sistema NO/material e t é o tempo de libertação. No modelo de Korsmeyer-Peppas n é o expoente de libertação que depende do mecanismo e da forma das partículas do sólido estudado que caracteriza o mecanismo de libertação. Com efeito, $n \leq 0,50$ corresponde a um mecanismo de libertação puramente Fickiano, $n = 1$ corresponde a uma cinética de libertação de ordem zero, sendo a libertação controlada por mecanismo de transporte de Caso II. Valores de $n > 1$ correspondem a um mecanismo de transporte super Caso II e valores de n entre 0,5 e 1 indicam uma cinética de transporte anómalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos (difusão e transporte Caso II). As constantes k_d e k_r (equação V. 1.3) correspondem ao coeficiente de difusão (difusão de Fick) e relaxação (transporte Caso II), respetivamente, e m corresponde ao expoente de difusão puramente Fickiana.^{94, 99, 101} Os parâmetros de regressão foram determinados usando o software OriginPro 8,5. Uma vez que os modelos cinéticos das equações V.I.1 a V.I.3 possuem diferentes variáveis, utilizou-se o critério de Akaike¹⁰² (AIC) no ajuste das variáveis, ao invés do usual coeficiente de regressão (R^2). De acordo com o método da AIC, a libertação em fase gasosa rege-se pelo modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação V.1.2) evidenciando a prevalência de uma libertação puramente Fickiana.¹⁰⁰

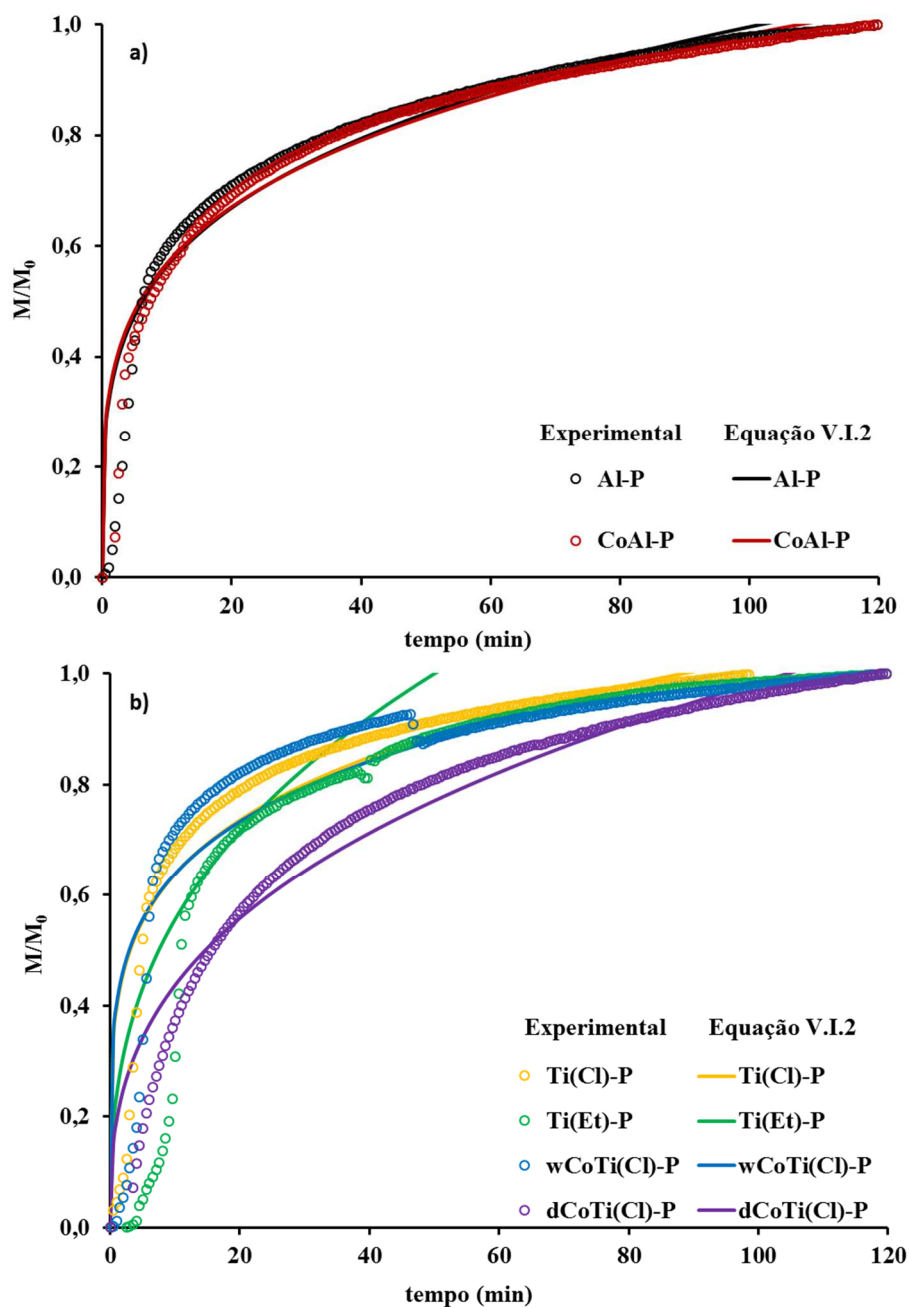


Figura V.I. 8 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase gasosa.

A Figura V.I. 8 ilustra a fração libertada de NO na fase gasosa em função do tempo. Compararam-se os resultados experimentais (pontos) com os obtidos da aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas (linhas contínuas), os parâmetros de ajuste encontram-se na Tabela V.I. 3. De acordo com os resultados obtidos, a difusão mais rápida e mais lenta ocorreu para os materiais impregnados com iões cobalto, respetivamente wCoTi(Cl)-P e dCoTi(Cl)-P. O tipo de impregnação parece influenciar a interação do NO com o material o que pode ser comprovado também pelos teores de NO que cada um destes materiais adsorve e liberta -

Tabela V.I. 2. Nos restantes materiais a constante de velocidade é relativamente semelhante, não indicando haver diferenças relevantes no tipo de pilares.

Tabela V.I. 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a libertação em fase gasosa

Material	Fase Gasosa	
	<i>k</i>	<i>n</i>
Al-P	0,319 ± 0,008	0,247 ± 0,006
CoAl-P	0,330 ± 0,005	0,237 ± 0,004
Ti(Cl)-P	0,397 ± 0,011	0,206 ± 0,007
Ti(Et)-P	0,240 ± 0,013	0,316 ± 0,013
wCoTi(Cl)-P	0,404 ± 0,015	0,199 ± 0,009
dCoTi(Cl)-P	0,194 ± 0,005	0,353 ± 0,006

k, constante cinética da equação de Korsmeyer-Peppas (min⁻ⁿ); *n*, expoente de libertação.

V.I.2.2 – Fase líquida

Os estudos de libertação de óxido nítrico foram também realizados em fase líquida, usando o método da oxi-hemoglobina,⁸⁶ como descrito no capítulo da parte experimental (secção IV.3) no qual se observa a transformação da oxiHb em metHb ao longo do tempo, à medida que o NO se vai libertando. Na Figura V.I. 9 pode observar-se em a) que o espectro da oxiHb se manteve inalterado ao longo das 2h, o mesmo já não acontecendo quando se adicionou à solução de oxiHb os materiais carregados com NO. Nesta figura estão apenas ilustrados os casos de alguns materiais (restantes espectros em anexo – Figuras A.IV.1 a A.IV.3), em alguns casos a transformação da oxiHb em metHb é clara, como se pode observar em b) e d), evidenciando a libertação de NO.

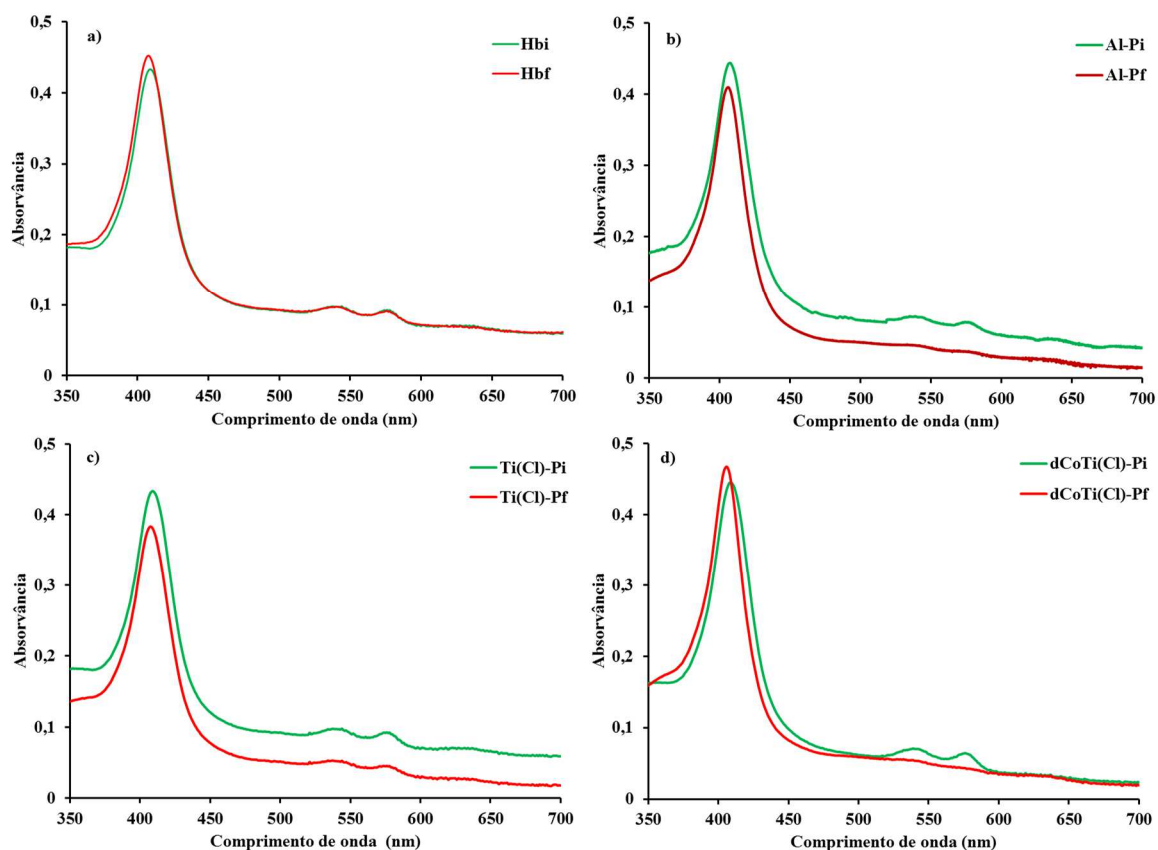


Figura V.I. 9 – Espectros de UV-Vis inicial e final após 2h de ensaio. Comparação entre o espectro da oxiHb (a) e alguns materiais após 2 h de liberação de NO (b, c, d).

Os resultados, na forma de concentração de NO versus tempo, encontram-se apresentados na Figura V.I. 10. Novamente, o dCoTi(Cl)-P foi o material que libertou a maior quantidade de NO, mais do que o dobro em comparação com os restantes materiais, chegando a atingir uma concentração de NO libertado de 1,06 μM - Tabela V.I. 4.

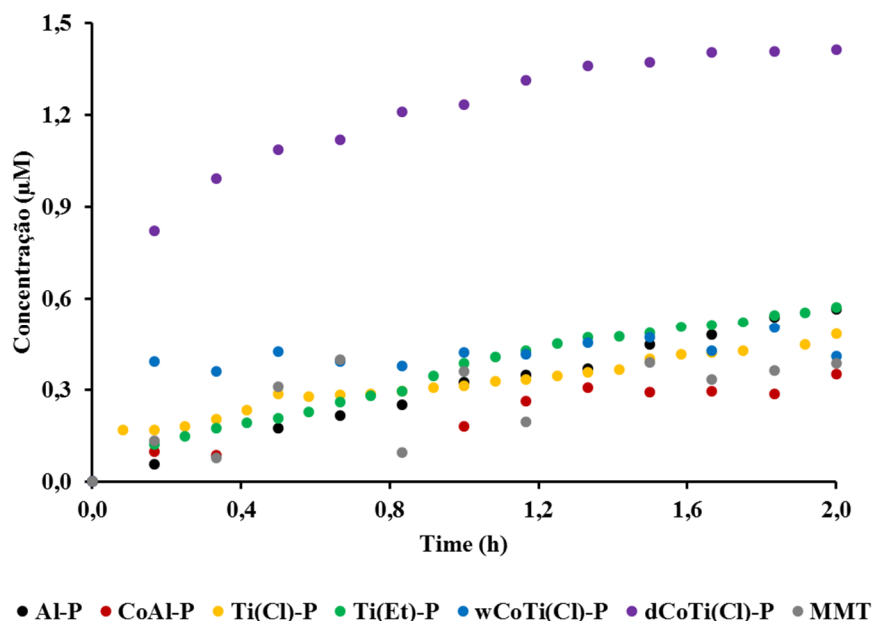


Figura V.I. 10 - Liberação de NO em fase líquida em função do tempo.

Em fase líquida os teores de NO libertados são aproximadamente os mesmos independentemente do tipo de pilares, excetuando o dCoTi(Cl)-P como foi já referido, não se observando as diferenças que ocorreram entre os vários tipos de pilares em fase gasosa. Ao passo que na fase gasosa a Al-P foi uma das amostras que libertou menos NO, na fase líquida mostrou um comportamento mais vantajoso, sendo a concentração final de NO próxima da obtida para o material Ti(Et)-P (Tabela V.I. 4).

Tabela V.I. 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.

Material	[NO] (µM)	[NO] (µM/g _{material})	mNO (µg/g _{material})
Al-P	0,42	93	8
CoAl-P	0,26	58	5
Ti(Cl)-P	0,36	80	7
Ti(Et)-P	0,43	96	9
wCoTi(Cl)-P	0,31	69	6
dCoTi(Cl)-P	1,06	236	21

Aos resultados da cinética de liberação de NO em fase líquida, foram aplicados os modelos matemáticos descritos (Equações V.I.1 a V.I.3). Dos modelos aplicados o que melhor se ajusta à liberação em fase líquida é o modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação V.I.2) - Figura V.I. 11. Embora a cinética de liberação de NO seja regida pelo mesmo

modelo de liberação, tanto em fase líquida como em fase gasosa, este parece ajustar-se melhor aos resultados obtidos na fase líquida.

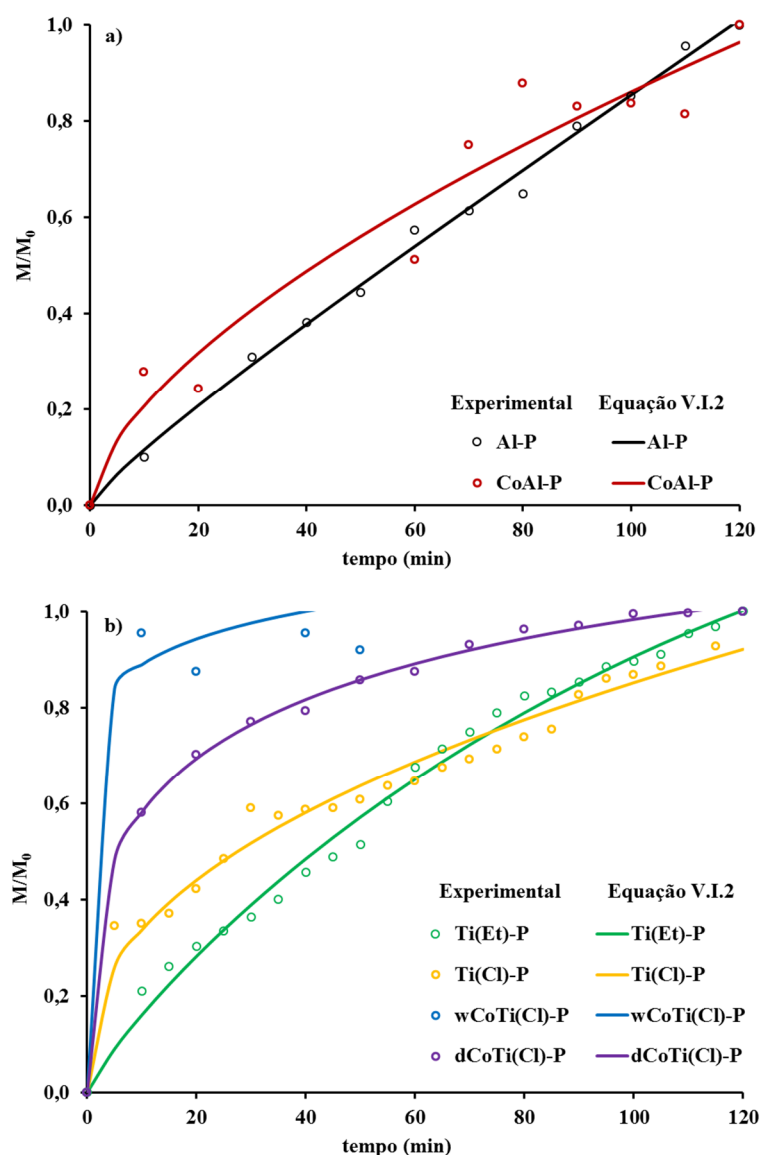


Figura V.I. 11 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase líquida.

Observando as figuras V.I.8 e V.I.11, verifica-se que a cinética de liberação de NO é mais lenta em fase líquida do que em fase gasosa. Os parâmetros da equação de Korsmeyer-Peppas encontram-se apresentados na Tabela V.I. 5. As amostras com pilares de óxido de titânio preparadas a partir do cloreto de titânio apresentam uma difusão puramente Fickiana. Os materiais Al-P, CoAl-P e Ti(Et)-P apresentam uma difusão não Fickiana, ou seja, a difusão não depende apenas do gradiente de concentração. As amostras Al-P, Ti(Et)-P e

dCoTi(Cl)-P foram as que apresentam os melhores ajustes. Entre estes, Al-P e Ti(Et) -P apresentaram uma libertação quase linear ao longo do tempo (Figura V.I. 11). Esta é a situação mais favorável uma vez que uma relação direta entre o tempo e a quantidade libertada permite um controlo mais fácil sobre a concentração do fármaco.

Tabela V.I. 5 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a libertação em fase líquida.

Material	Fase Líquida	
	<i>k</i>	<i>n</i>
Al-P	0,014 ± 0,0020	0,89 ± 0,031
CoAl-P	0,050 ± 0,0231	0,62 ± 0,102
Ti(Cl)-P	0,130 ± 0,0129	0,41 ± 0,023
Ti(Et)-P	0,039 ± 0,0037	0,69 ± 0,022
wCoTi(Cl)-P	0,730 ± 0,0943	0,09 ± 0,031
dCoTi(Cl)-P	0,362 ± 0,0125	0,22 ± 0,008

k, constante cinética da equação de Korsmeyer-Peppas (min⁻ⁿ); *n*, expoente de libertação.

Tal como ilustrado na Tabela V.I. 5, a amostra Al-P é a que apresenta a cinética mais lenta. Tal facto, para além da interação do NO com os pilares de óxido de alumínio tal como discutido mais acima, estará provavelmente relacionado com a distribuição do tamanho dos poros das amostras (Figura V.I. 4). Na verdade, a amostra de Al-P apresenta largura de poros essencialmente na região dos microporos (poros com um máximo próximo de 1,5 nm), ao passo que as amostras com pilares de óxido de titânio, embora possuam largura de poros na mesma região como a amostra Al-P, também apresentam poros de maior largura, até 3,5 nm (como referido mais acima). Uma evidência adicional que mostra a importância do tamanho dos poros é dada pelo parâmetro energético E_0 (Tabela V.I. 1) dado pela equação de Dubinin-Astakhov (D-A)^{81, 103, 104} aplicado à adsorção de azoto. De uma forma resumida, a equação D-A é dada por $w = w_0 \exp[-(A/E)^n]$ onde o volume adsorvido w está relacionado com o volume total de adsorção w_0 , A é o potencial de adsorção ($A = RT \ln(p^0/p)$) e E_0 é a energia característica, que está inversamente relacionada com a dimensão dos poros. De fato, a Al-P (assim como a CoAl-P) é a que apresenta maior valor de E_0 . Por conseguinte, e tendo em conta a ausência de uma interação mais específica com a molécula de NO que, aparentemente, os vários materiais preparados com pilares de óxido de titânio não foram capazes de desenvolver, é o material com a maior proporção de poros menores que apresenta os melhores resultados para a adsorção / libertação da molécula de NO.

V.I.3 – Conclusão

Preparou-se um conjunto de materiais a partir de uma argila natural do tipo Montmorilonite, que passou pela formação de pilares recorrendo a vários tipos de oligocatiões. Obtiveram-se assim pilares de óxido de alumínio, de óxido de titânio e pilares mistos de óxidos de alumínio/cobalto e óxidos de titânio/cobalto. Os materiais foram caracterizados quanto à sua estrutura e porosidade, sendo essencialmente materiais microporosos mas, em particular para nas amostras com pilares de óxido de titânio, foi também encontrada mesoporosidade.

A adsorção e libertação de óxido foi estudada nos materiais preparados, tanto em fase gasosa como em fase líquida. As quantidades de NO adsorvido na fase gasosa, assim como os perfis de libertação, não foram totalmente em linha com as propriedades texturais, tais como a área superficial e volume de poros. Tal fato sugere a possível existência de uma interação entre as moléculas de NO e os materiais. Os valores de NO libertados na fase líquida não ultrapassam os limites biológicos e, para alguns materiais, obteve-se uma cinética de libertação lenta com, inclusive, uma relação quase direta entre a fração de NO libertada e o tempo.

Tendo em conta os resultados obtidos, nomeadamente, os teores de No adsorvidos/libertados, bem como os parâmetros cinéticos de libertação, a Al-P, Ti(Cl)-P, Ti(Et)-P e dCoTi(Cl)-P foram as amostras que mostraram um maior interesse para a realização de ensaios toxicológicos (secção V.V) .

V.II – Materiais a partir da Sepiolite

V.II.1 – Caracterização dos materiais

Como referido na parte experimental (Secção IV.I.2), sintetizaram-se PILCs com pilares de óxido de alumínio (AlS-P) a partir de uma argila do tipo Sepiolite. Foram também sintetizados PILCs com óxidos mistos de titânio/cobalto (TiCoS-P) e titânio/zinco (TiZnS-P) a partir da Sepiolite após troca iónica por iões cobalto (CoS-P) e iões zinco (ZnS-P) tendo também sido estudada a Sepiolite de partida.

Após o processo de troca iónica as argilas CoS e ZnS ficaram com aproximadamente 2 % em massa do respetivo ião, conforme determinado por Absorção Atómica. Após a introdução dos iões titânio, o teor de iões cobalto e zinco diminuiu para 1 e 0,1 %, respetivamente. Embora o teor de iões titânio introduzido tenha sido aproximadamente o mesmo em ambas as amostras, 8 % para TiCoS-P e 7 % para TiZnS-P, os iões titânio poderão ter substituído alguns dos iões cobalto e zinco.

As curvas de TG-DSC de todas as amostras não calcinadas, incluindo a Sepiolite de partida, encontram-se na Figura V.II. 1. Quando a Sepiolite é aquecida, começa a sofrer desidratação. A perda de água ocorre em várias etapas: (i) perda de água adsorvida; (ii) perda de água zeolítica, isto é, a água ligada aos catiões troca; (iii) a perda das primeiras moléculas de água coordenadas à folha octaédrica; (iv) a perda da restante água coordenada; (v) deshidroxilação da folha tetraédrica.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ A perda de massa mais acentuada ocorreu entre 50-125 °C para todas as amostras, correspondendo a 5-17 % para Sepiolite, AlS-P e TiCoS-P, 23 % para TiZnS-P, atribuíveis à perda de água fisicamente adsorvida. No caso dos materiais CoS e ZnS esta perda de massa foi menor (cerca de 8 %). NaSepiolite, uma segunda fase de perda de massa, cerca de 3 %, ocorreu entre 250-300 °C, a qual foi atribuída à remoção da água zeolítica nos poros estruturais. Uma última etapa foi notada, até aos 600 °C, com perda de massa de 4 %, devido à libertação da água coordenada à Sepiolite.¹⁰⁵

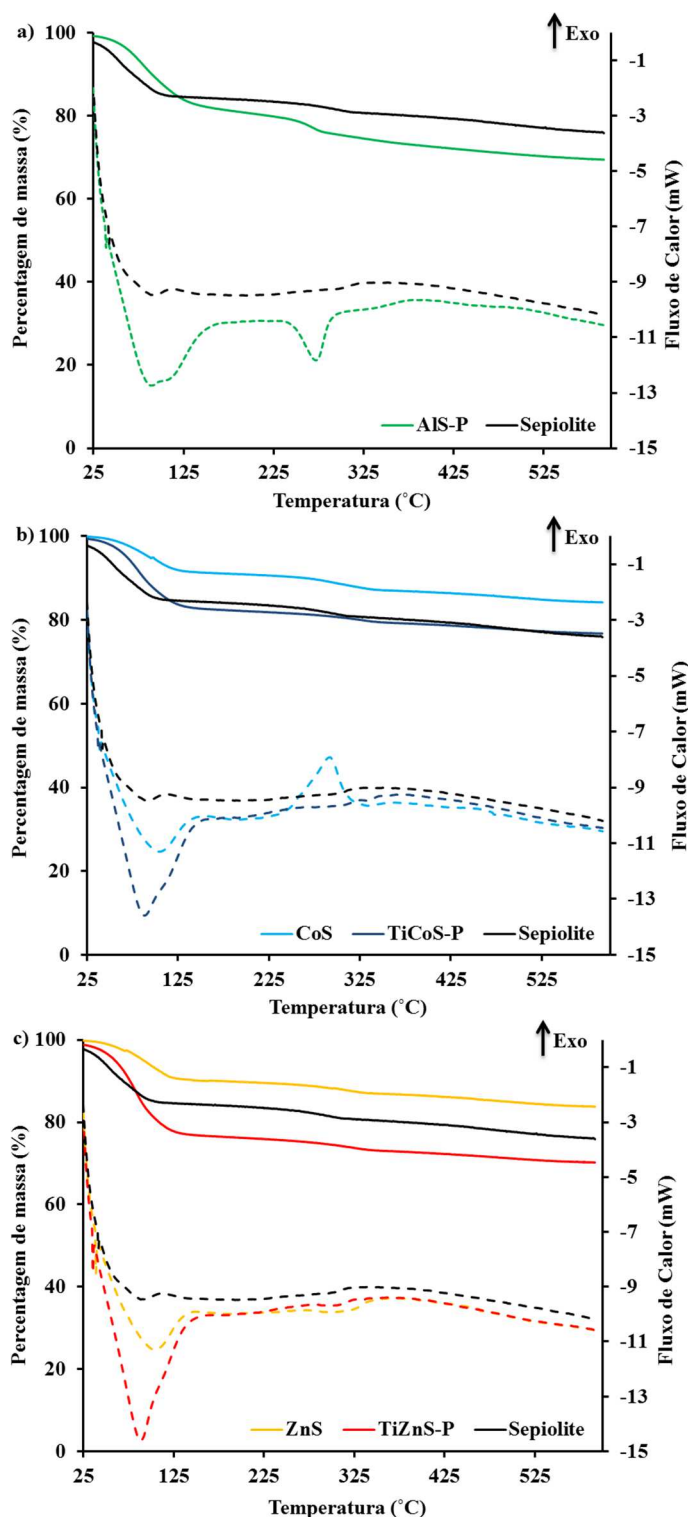


Figura V.II. 1 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas): a) argila de partida e PILC de óxido de alumínio; b) argila de partida, argila impregnada com íons cobalto e PILC de óxidos de titânio/cobalto; c) argila de partida, argila impregnada com íons zinco e PILC

Em todas as PILCs e amostras intercaladas, a perda de água originou um pico, na curva de fluxo de calor, que é mais intenso do que na Sepiolite de partida. Adicionalmente, na AIS-P, uma perda de massa de 6 % foi observada entre os 250 – 300 °C, associada a um

pico endotérmico na curva de DSC. Este pico foi atribuído na literatura⁶⁰ à transformação da espécie oligomérica intercalada nos respectivos pilares de óxidos, ou seja, à formação dos pilares de óxido de alumínio.

As amostras TiCoS-P e TiZnS-P apresentam picos endotérmicos a cerca de 100 °C um pouco mais intensos que nas amostras CoS e ZnS. As PILCs com óxido de titânio apresentaram uma ligeira curvatura para a zona endotérmica, por entre os 250 - 300 °C, à qual corresponde uma perda de massa entre 4 e 6 %, que como no caso da AlS-P, podem ser relacionados com a formação dos pilares. Adicionalmente, a massa continuou a diminuir (2-8 %) até os 600 °C, devido à contínua desidroxilação. Na amostra CoS, entre os 250 - 300 °C, surgiu um pico exotérmico o qual não foi passível de ser explicado.

Para confirmar a formação de pilares, após calcinação das amostras (AlS-P, TiCoS-P e TiZnS-P), traçaram-se os respectivos difractogramas de raios X - Figura V.II. 2 a). Obtiveram-se também os difractogramas de raios X para a Sepiolite, e para as amostras obtidas por troca iónica (CoS e ZnS). O difractograma da Sepiolite é caracterizado por uma forte reflexão próximo de 7 ° de 2 Θ , correspondendo a um espaçamento basal (d_{110}) de cerca de 12 Å e várias outras reflexões moderadamente fracas na proximidade de 12, 13, 20, 21, 24, 27, 34, 35, 37 ° de 2 Θ característica de Sepiolite.⁹¹ Após a troca iónica, a CoS manteve a reflexão d_{110} bem definida, no entanto, a ZnS ficou com uma estrutura menos ordenada. A diminuição da cristalinidade foi também evidente nas PILCs com pilares de óxido de titânio. Por outro lado, para a AlS-P a reflexão d_{110} é claramente evidente por volta dos 7 ° de 2 Θ .

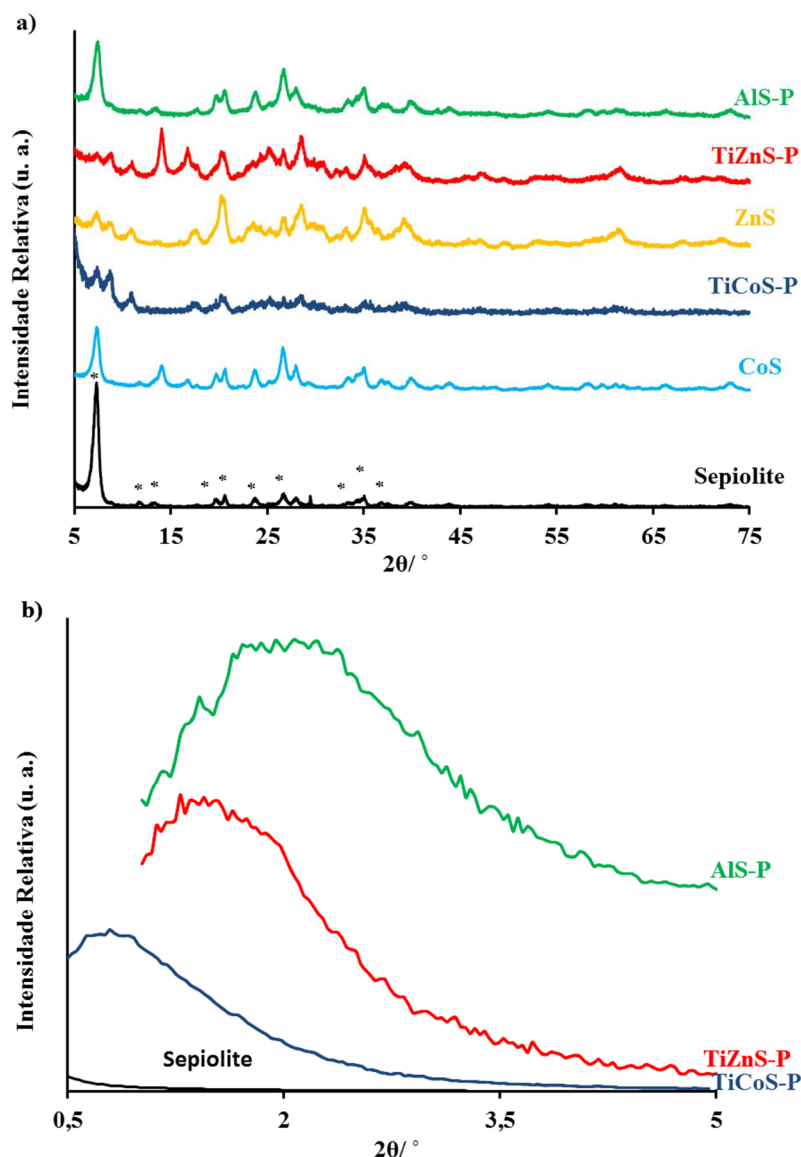


Figura V.II. 2 - Difractogramas de raios X de: a) Todas as amostras a uma maior largura de ângulo, b) PILCs obtidas a partir da Sepiolite a uma menos largura de ângulo. * - Reflexões características da Sepiolite.¹⁰⁸

O efeito da formação de pilares pode ser observado Figura V.II. 2b), onde se mostram dados de difração de raios X na zona de ângulos mais baixos. Desconhece-se, na literatura, que este tipo de resultados tenha sido observado no contexto da formação de pilares em materiais derivados da Sepiolite. Esta figura mostra uma nova e intensa reflexão (ausente na Sepiolite inicial) que deverá ser consequência da formação dos pilares.

A Figura V.II. 3 a) mostra as isotérmicas de adsorção-desadsorção de azoto na Sepiolite de partida e na Sepiolite após troca iônica com íons cobalto e zinco, que se mantêm muito semelhantes. Na Figura V.II. 3 b) são mostradas as isotérmicas de adsorção de azoto

das argilas com pilares. As isotérmicas são semelhantes para todos os materiais sendo do tipo IIb.⁸¹

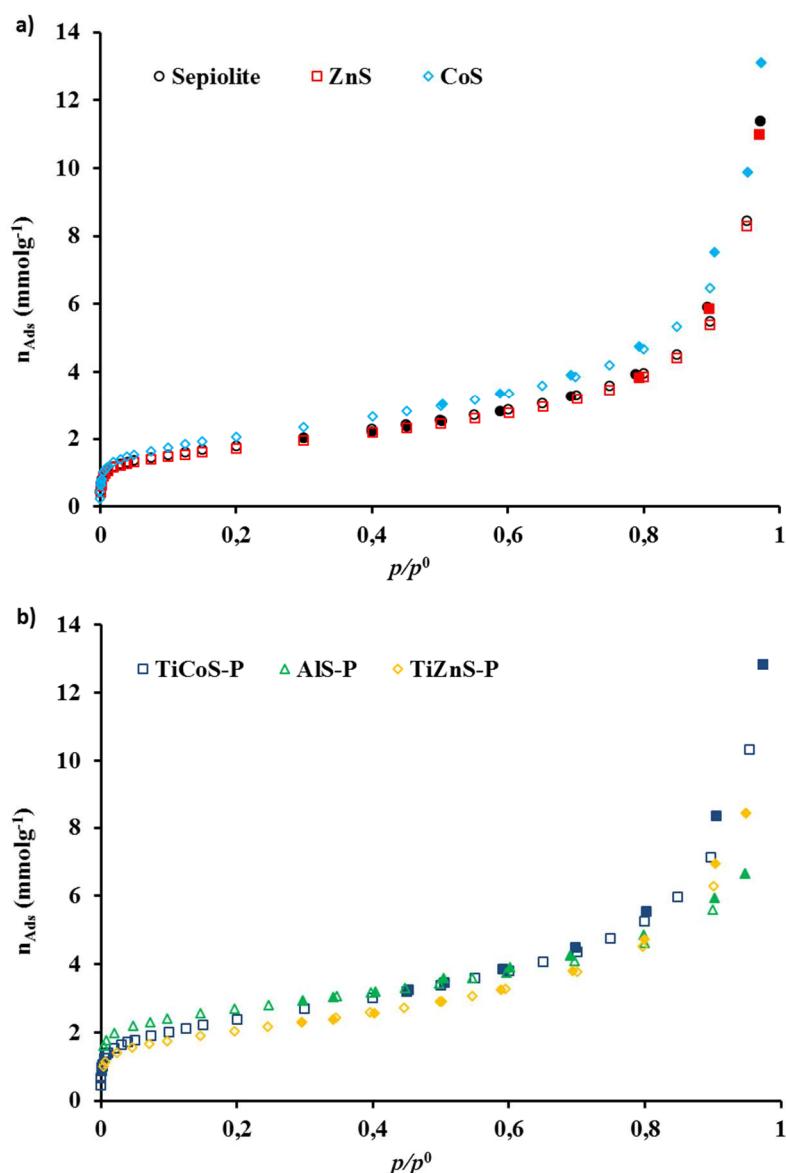


Figura V.II. 3 - Isotérmicas de adsorção de azoto a -196 °C.

Abaixo da pressão relativa de 0,4 isto é, na gama de pressões relativas em que a adsorção nos microporos é completa (poros de largura inferior a 2 nm), mas a condensação capilar nos mesoporos ainda não começou (largura de poro entre 2 e 50 nm), no material AIS-P registam-se as quantidades adsorvidas mais elevadas sendo o que apresenta a maior A_{BET} . De igual modo, AIS-P é o material que com a formação de pilares apresentou microporosidade- Tabela V.II. 1. A extensão da histerese é semelhante para os diferentes materiais, no entanto, é ligeiramente maior nas amostras com pilares (AIS-P, TiCoS-P e TiZnS-P). Em geral, o processo de formação de pilares não gerou um grande aumento da

área superficial (Tabela V.II. 1) sendo o valor mais elevado alcançado pela AIS-P. Do mesmo modo, o volume microporoso também não aumentou excetuando o caso da amostra AIS-P.

Tabela V.II. 1 - Parâmetros texturais, onde, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA.

Material	A_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	V_{μ} ($cm^3 g^{-1}$)	V_m ($cm^3 g^{-1}$)	E_0 ($kJmol^{-1}$)
Sepiolite	141	0,007	0,391	4,62
AIS-P	206	0,039	0,193	5,29
CoS	161	0,004	0,454	4,37
TiCoS-P	185	0,007	0,442	4,77
ZnS	134	0,006	0,378	4,16
TiZnS-P	160	0,008	0,286	4,48

Relativamente à distribuição do tamanho das aberturas dos poros - Figura V.II. 4, verificou-se que nos materiais em que se realizou a troca iónica com cobalto e zinco (CoS e ZnS) a distribuição da dimensão dos poros, que na Sepiolite inicial surge no intervalo 19 - 24 nm, se tornou mais larga. A introdução de pilares fez alargar ainda mais essa distribuição, para além de ter gerado poros de dimensão próxima dos microporos. Foi, no entanto, a amostra AIS-P que mais se destacou das restantes PILCs. A introdução de pilares de óxido de alumínio originou poros de menores dimensões levando inclusive-à formação de microporos - Tabela V.II. 1.

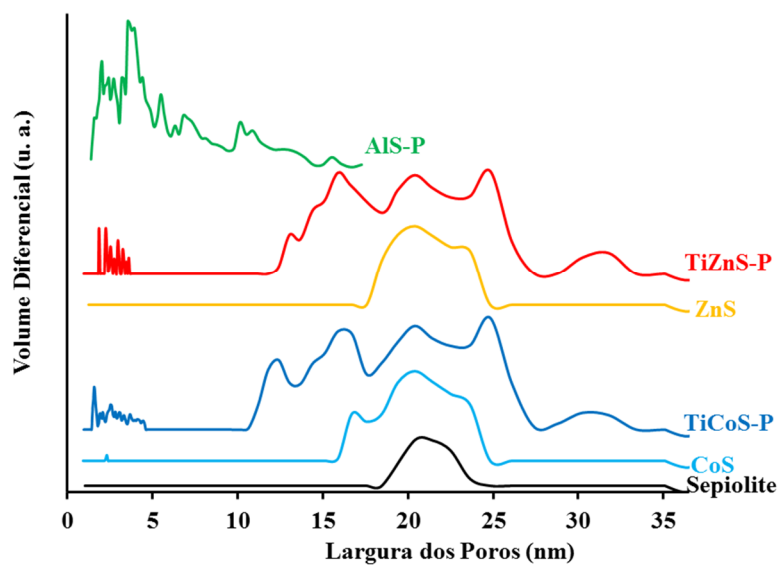


Figura V.II. 4 - Distribuição de tamanho de poros.

V.II.2 – Estudos de adsorção e de liberação de NO

V.II.2.1 – Fase gasosa

Os resultados de adsorção e de liberação de óxido nítrico encontram-se nas Figuras V.II.5 e V.II.6, respetivamente.

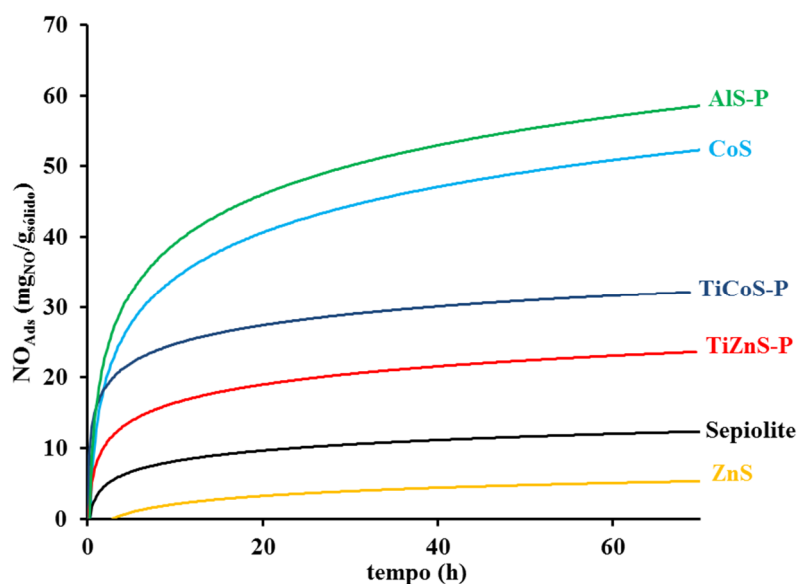


Figura V.II. 5 - Adsorção de NO em fase gasosa (a 25 °C).

Os teores de NO adsorvido encontram-se entre 0,8 e 5,9 % em massa (ver Tabela V.II. 2). A amostra AIS-P foi a que mais quantidade de NO adsorveu, levando a um aumento de 5,9 % em massa, um valor semelhante ao encontrado, por exemplo, nos zeólitos do tipo A.²² A troca iônica da Sepiolite com íons zinco não melhorou o teor de NO adsorvido, pelo contrário, adsorveu menos que a própria Sepiolite. No entanto, os íons cobalto parecem apresentar uma melhor afinidade para com o NO, uma vez que tanto a CoS como a TiCoS-P adsorvem mais NO do que a ZnS ou a TiZnS-P, embora a introdução de pilares de óxido de titânio tenha conduzido a uma diminuição na adsorção de NO comparativamente com a CoS.

Tabela V.II. 2 - Adsorção e liberação de NO em fase gasosa.

Material	%NO_{Ads}^a	NO_{Ads}^b	NO_{Lib}^c	NO_{Lib}^d
Sepiolite	1,3	12,8	7,5	8,3
AIS-P	5,9	59,0	17,6	26,4
CoS	5,4	53,6	27,6	36,2
TiCoS-P	3,2	31,9	9,4	12,8
ZnS	0,8	7,7	7,7	7,7
TiZnS-P	2,3	23,5	11,9	15,4

^a máximo de NO adsorvido na fase gasosa, ^b máximo de NO adsorvido na fase gasosa (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹), ^c NO libertado ao fim de 2h (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹) em fase gasosa, ^d NO libertado em fase gasosa ao fim de 20 h (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹)

No que diz respeito à liberação de óxido nítrico, como pode ser observado na Figura V.II. 6, a amostra ZnS apresentou uma cinética de liberação muito rápida, libertando toda a quantidade de NO adsorvido na primeira meia hora. Os materiais AIS-P e TiCoS-P apresentaram um comportamento de liberação de NO semelhante entre si, a liberação foi lenta, mas, com valores finais de NO retido, após 20 h, ainda consideravelmente elevados, quando comparado com outros sólidos.

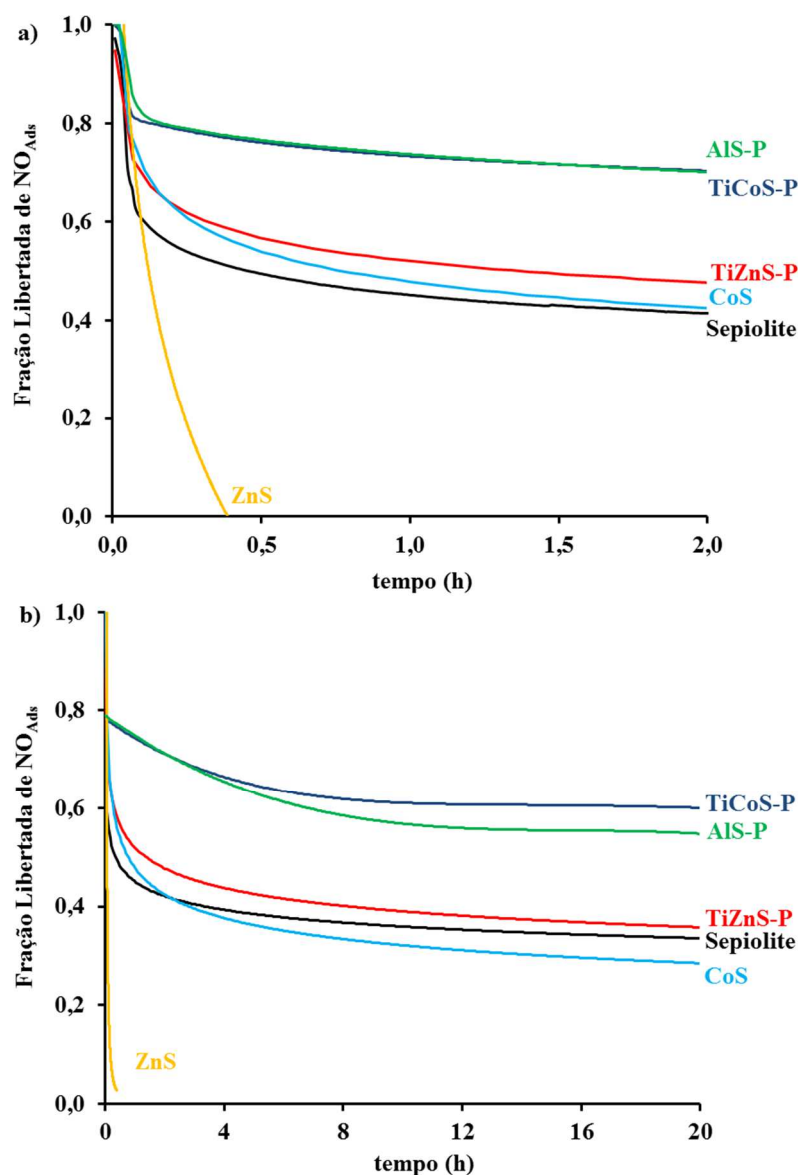


Figura V.II. 6 - Liberação de NO na fase gasosa (a 25 °C). a) ao fim de 2h; b) ao fim de 20 h.

Para quantificar os resultados da cinética de liberação de NO acima apresentados, utilizaram-se os mesmos modelos matemáticos usados nos materiais a partir da Montmorilonite, que estão relacionados com a cinética de liberação de compostos com fins terapêuticos. Todo o procedimento de ajuste dos modelos foi feito de acordo o descrito na secção V.I.2.1.

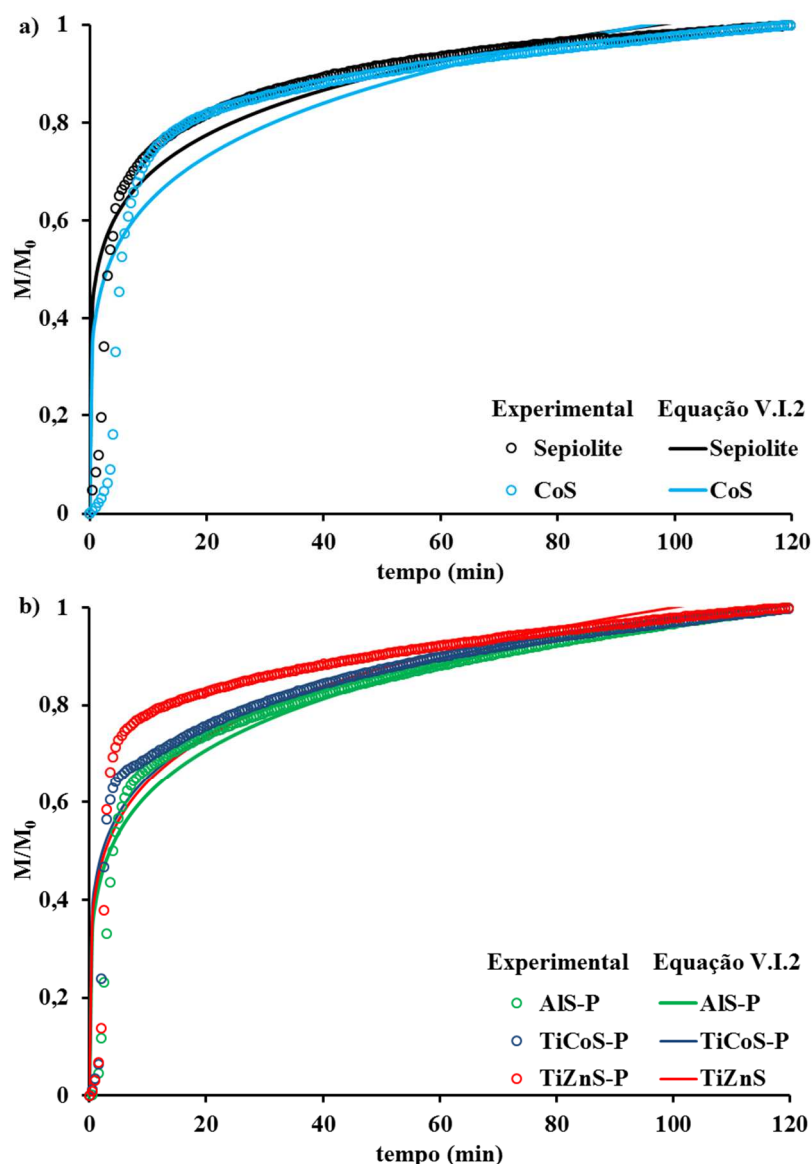


Figura V.II. 7 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase gasosa.

De acordo com o método da AIC, a liberação de NO em fase gasosa rege-se pelo modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação V.I.2), evidenciando a prevalência de uma liberação Fickiana.¹⁰⁰ Tendo em conta os resultados obtidos para a amostra ZnS, não foi possível ajustar nenhum dos modelos matemáticos usados. A Figura V.II. 7 ilustra a fração libertada de NO na fase gasosa em função do tempo. Compararam-se os resultados experimentais (pontos) com os obtidos da aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas (linhas contínuas), os parâmetros de ajuste encontram-se na Tabela V.II. 3. Comparando os resultados da Figura V.II. 7 com os valores da Tabela V.II. 3 verificou-se que a cinética de liberação de NO não é acentuadamente diferente entre os vários materiais. No entanto, de acordo com resultados obtidos, a difusão mais rápida e mais lenta ocorreu para a Sepiolite e

para o material com pilares de óxido de alumínio (AlS-P), respetivamente. A troca iónica parece não ter influência na interação do NO com o material, já o tipo de pilares (óxido de alumínio ou óxido de titânio) parece ter influência.

Tabela V.II. 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a libertação em fase gasosa

Material	Fase Gasosa	
	<i>k</i>	<i>n</i>
Sepiolite	0,477 ± 0,011	0,162 ± 0,006
AlS-P	0,389 ± 0,008	0,200 ± 0,005
CoS	0,401 ± 0,015	0,200 ± 0,009
TiCoS-P	0,433 ± 0,009	0,178 ± 0,005
TiZnS-P	0,413 ± 0,018	0,192 ± 0,010

k, constante cinética da equação de Korsmeyer-Peppas (min⁻ⁿ); *n*, expoente de libertação.

V.II.2.2 – Fase líquida

Os estudos de libertação de óxido nítrico foram também realizados em fase líquida, usando o método da oxi-hemoglobina⁸⁶, como descrito no capítulo da parte experimental (secção IV.3) no qual se observa a transformação da oxiHb em metHb ao longo do tempo, à medida que o NO se vai libertando. Na Figura V.II. 8 podem observar-se os espectros da solução de oxiHb e a sua transformação em metHb à medida que o NO se foi libertando, na Sepiolite e nos materiais com pilares preparados a partir da argila (em anexo encontram-se os ensaios de UV-Vis traçados aquando da adição dos materiais CoS e ZnS carregados com NO- Figuras A.IV.4 e A.IV.5). Como se pode observar na Figura V.II. 8, todos os materiais libertaram NO, visto ter havido transformação da oxiHb inicial em metHb.

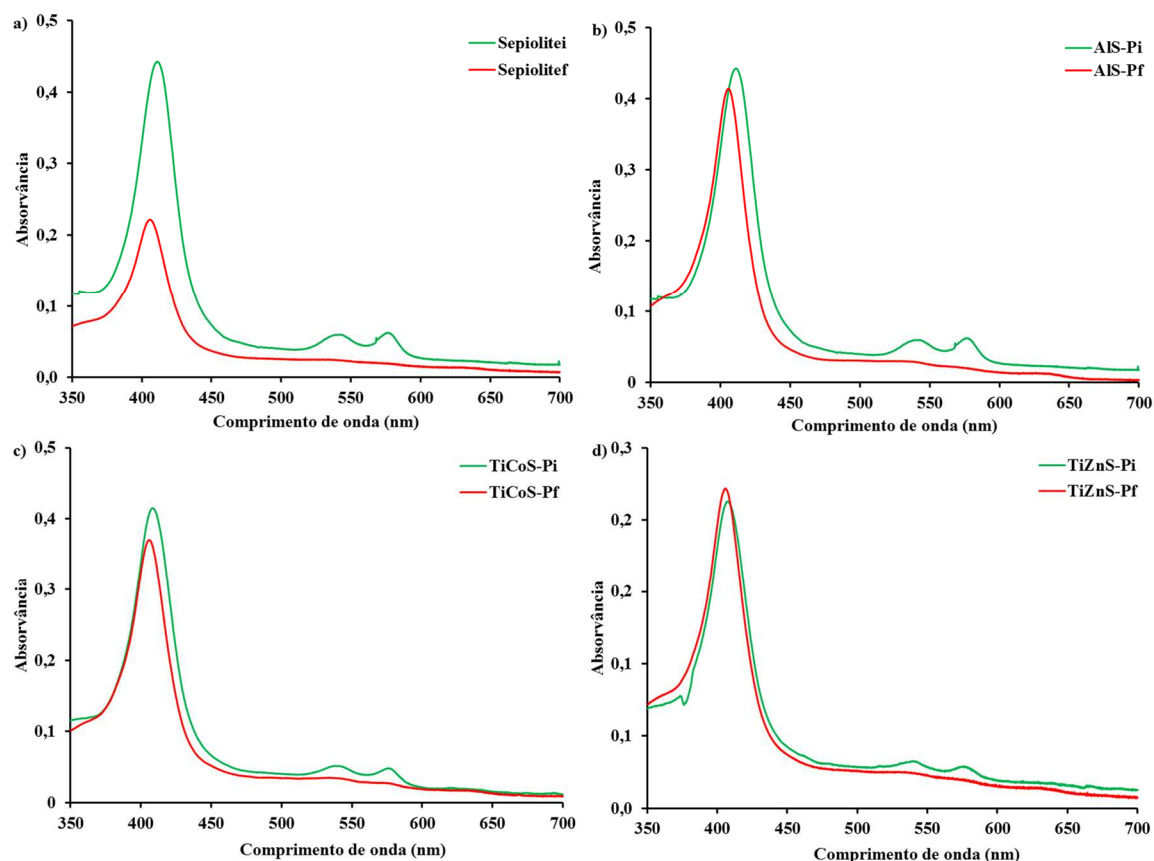


Figura V.II. 8 – Espectros de UV-Vis da hemoglobina inicial e final após 2h de ensaio de liberação de NO. Comparação entre a Sepiolite de partida (a) e as PILCs formadas a partir da Sepiolite (b, c, d). (i – espectro inicial; f – espectro final)

Os resultados na forma de concentração de NO *versus* tempo encontram-se apresentados na Figura V.II. 9. A amostra AIS-P foi a que libertou a maior quantidade de NO alcançando uma concentração de 2,1 μM , seguida pela Sepiolite inicial - Tabela V.II. 4. A amostra CoS liberta num tempo muito curto, o que torna a interpretação dos resultados muito limitada neste caso.

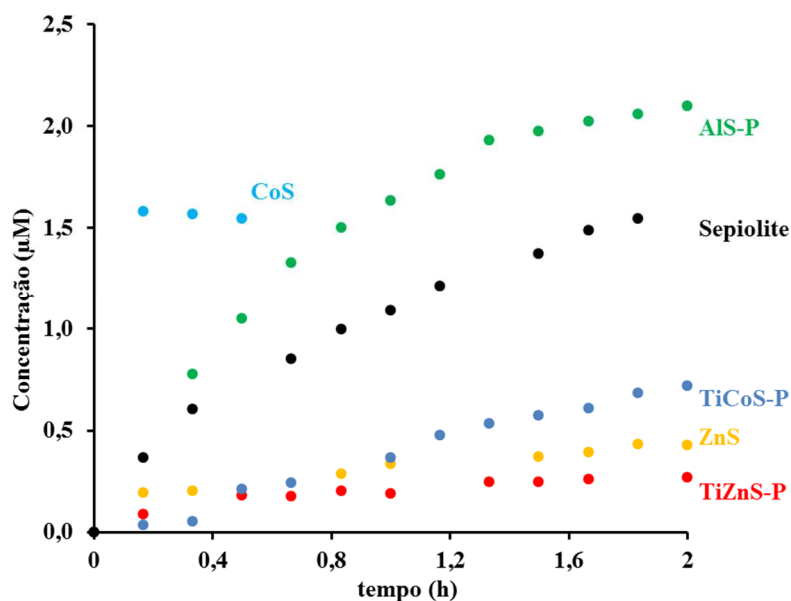


Figura V.II. 9 - Liberação de NO em fase líquida em função do tempo.

Comparando com a liberação em fase gasosa, a AIS-P continua a ser a que maior teor de NO liberta ao passo que a Sepiolite foi uma das amostras que na fase gasosa libertou menos NO mas em fase líquida mostrou um comportamento mais vantajoso, aproximando-se da bastante da AIS-P (Tabela V.II. 4).

Tabela V.II. 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.

Material	[NO] (µM)	[NO] (µM/g _{material})	mNO (µgNO/g _{material})
Sepiolite ^a	1,50	333	30
AIS-P	2,10	467	42
CoS ^b	1,58	351	32
TiCoS-P	0,72	160	14
ZnS	0,43	96	9
TiZnS-P	0,27	60	5

^{a)} ao fim de 110 min; ^{b)} ao fim de 10 min.

Aos resultados da cinética de liberação de NO em fase líquida, foram aplicados os modelos matemáticos anteriormente descritos (Equação V.I.1 a Equação V.I.3). Dos modelos aplicados o que melhor se ajusta à liberação em fase líquida é o modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação V.I.2) - Figura V.II. 10.

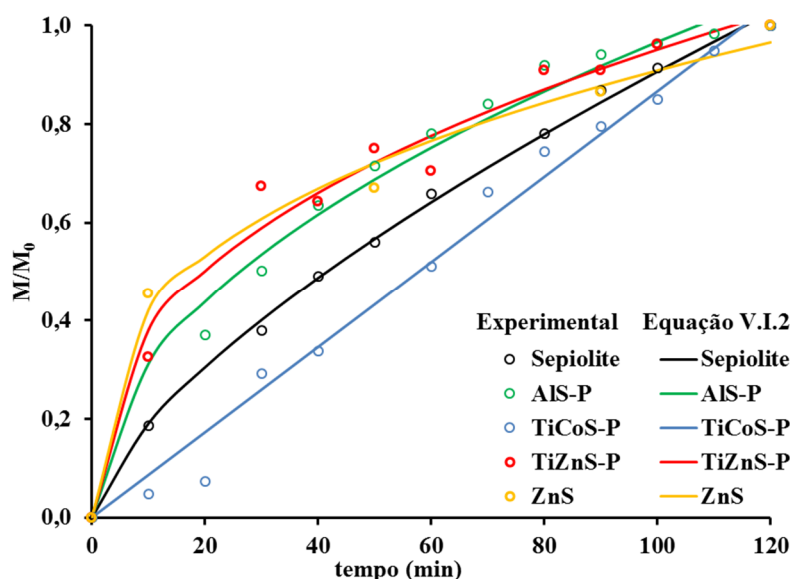


Figura V.II. 10 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase líquida.

Observando as Figuras V.II.6 e V.II.10 verifica-se que a cinética de liberação de NO é bastante mais lenta em fase líquida do que em fase gasosa. Os parâmetros da equação de Korsmeyer-Peppas encontram-se apresentados na Tabela V.II. 5.

Os coeficientes de difusão, n , (Tabela V.II. 5) são em geral mais elevados na liberação de NO em fase líquida do que em fase gasosa, o que pode dever-se aos diferentes mecanismos de liberação em cada uma das fases.¹⁰⁰ Apenas as amostras que contêm zinco apresentam uma difusão puramente Fickiana de acordo com o valor do expoente n . Na verdade, valores de n superiores a 0,5 podem ser interpretados como resultado de uma junção de mecanismos, que inclui difusão Fickiana mas também o mecanismo de relaxamento (transporte de Caso II) devido, por exemplo, à expansão do material,^{96, 98, 100, 101} como consequência da interação com o meio de liberação (solução de oxiHb). Estas interações com o meio de liberação são mais prováveis de ocorrer em fase líquida do que em fase gasosa, e podem justificar as diferenças maiores nos valores de k e n obtidos entre os materiais, no caso dos estudos em fase líquida. É importante realçar que a Sepiolite e o TiCoS-P apresentam perfis de liberação em fase líquida que se aproximam muito da linearidade-Figura V.II. 10. Como foi já referido, esta é a situação mais favorável uma vez que a relação direta entre o tempo e a quantidade libertada permite um controlo mais fácil da concentração do fármaco.

Tabela V.II. 5 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a libertação em fase líquida.

Material	Fase Líquida	
	<i>k</i>	<i>n</i>
Sepiolite	0,040 ± 0,678	0,678 ± 0,018
AlS-P	0,100 ± 0,015	0,492 ± 0,035
TiCoS-P	0,009 ± 0,002	1,002 ± 0,064
ZnS	0,195 ± 0,034	0,334 ± 0,040
TiZnS-P	0,152 ± 0,025	0,398 ± 0,039

k, constante cinética da equação de Korsmeyer (min^{-n}); *n*, expoente de libertação.

Tal como referido anteriormente o tipo de pilares parece influenciar a interação com o NO. Em fase gasosa a AlS-P foi a amostra que apresentou a cinética de libertação mais lenta e em fase líquida foi a que mais NO libertou destacando-se bastante das amostras com pilares de óxido de titânio. Por outro lado, a distribuição do tamanho de poros também poderá influenciar - Figura V.II. 4. Na verdade, a amostra de AlS-P é a que apresenta poros de menores dimensões (inclusive apresenta alguma microporosidade, tamanho de poros abaixo dos 2 nm. Tal como referido na secção V.I.2.2, o parâmetro energético E_0 (Tabela V.II. 1) é evidência adicional que mostra a importância do tamanho dos poros.^{81, 103, 104} De facto, a AlS-P é a que apresenta maior valor de E_0 (maior interação, atribuível à existência de poros de menores dimensões) seguida pela TiCoS-P e a própria Sepiolite.

V.II.3 - Conclusão

Preparou-se um conjunto de materiais a partir de uma argila natural do tipo Sepiolite, através da troca iónica com iões cobalto ou iões zinco seguida da formação de pilares recorrendo a oligocatiões de titânio. Preparou-se também uma amostra com pilares de óxido de alumínio a partir da Sepiolite natural. Obtiveram-se assim materiais com pilares de óxido de alumínio, e pilares mistos de óxidos de titânio/zinco e pilares de óxidos de titânio/cobalto. Os materiais foram caracterizados quanto à sua estrutura e porosidade, sendo essencialmente materiais mesoporosos, mas, em particular para na amostra com pilares de óxido de alumínio, foi também encontrada microporosidade.

A adsorção e a libertação de óxido nítrico foram estudadas, nos materiais preparados, tanto em fase gasosa como em fase líquida. As quantidades de NO adsorvido em fase gasosa estiveram, de um modo geral, de acordo com as propriedades texturais das amostras, tais

como a área superficial e volume de poros, o que já não aconteceu nos perfis de libertação. Tal facto sugere a possível existência de uma interação entre as moléculas de NO e os materiais, nomeadamente com os que possuem óxido de alumínio e óxido cobalto. Os valores de NO libertados na fase líquida encontraram-se dentro dos limites biológicos e, para alguns materiais, obteve-se uma cinética de libertação lenta com, inclusive, uma relação quase direta entre a fração de NO libertada e o tempo.

Tendo em conta os resultados obtidos, nomeadamente, os teores de NO adsorvidos/libertados, bem como os parâmetros cinéticos de libertação, as amostras Sepiolite, ALS-P, e TiCoS-P foram as que mostraram um maior interesse para a realização posterior de ensaios toxicológicos (secção V.V).

V.III – “Organoclays”

V.III.1 – Caraterização dos materiais

Intercalaram-se duas argilas naturais, Montmorilonite e Sepiolite, com L-histidina (parte experimental - Secção IV.1.3), usando duas concentrações diferentes de aminoácido, obtendo-se assim quatro materiais L-HM1 e L-HM2 (preparados a partir da Montmorilonite) e L-HS1 e L-HS2 (preparados a partir da Sepiolite) em que L-H identifica a presença da L-histidina e os valores 1 e 2 correspondem, aos materiais menos e mais concentrados no aminoácido, respetivamente.

Em secções anteriores foram já apresentados os resultados referentes à difração de raios X, numa gama alargada de 2θ , das argilas de partida, Montmorilonite e Sepiolite (secções V.I e V.II, respetivamente). As reflexões características do espaçamento basal para estes minerais de argila surgem geralmente fortes e nítidas entre 7 e 8 ° de 2θ , correspondendo a um espaçamento basal de, aproximadamente, 14 e 12 Å.^{76, 90, 91} Por essa razão, nesta secção, apenas foi estudada a região de ângulos de 2θ inferiores a 10 °.

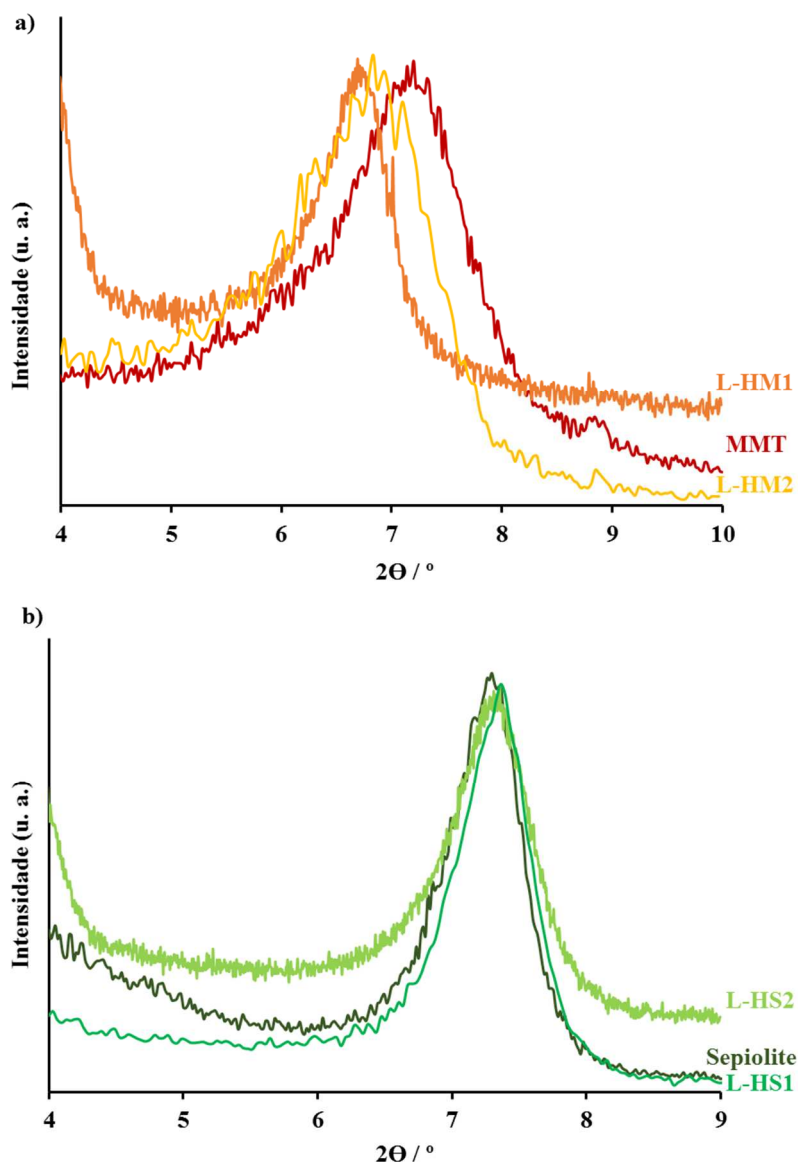


Figura V.III. 1- Difração de raios X da: a) Montmorilonite e respectivas argilas intercaladas com L-histidina, L-HM1 e L-HM2, b) Sepiolite e respectivas argilas intercaladas com L-histidina, L-HS1 e L-HS2.

O efeito da intercalação da L-histidina pode observar-se pelos resultados da DRX - Figura V.III. 1. Nas amostras a partir da Montmorilonite verificou-se o desvio, para ângulos mais baixos, da reflexão correspondente ao espaçamento basal, sugerindo que a L-histidina foi efetivamente intercalada nas camadas da argila. Os materiais intercalados, L-HM1 e L-HM2, apresentaram um espaçamento basal de 15,0 e 15,2 Å, respetivamente (Tabela V.III 1). No caso dos materiais intercalados a partir da Sepiolite, o espaçamento basal para L-HS1 e L-HS2 manteve o valor correspondente à argila de partida (Tabela V.III 1).

Tabela V.III 1 - Parâmetros texturais, onde, d_{001} corresponde ao espaçamento basal, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA.

Material	d_{001} (Å)	A_{BET} (m² g⁻¹)	V_{μ} (cm³ g⁻¹)	V_m (cm³ g⁻¹)	E_0 (kJmol⁻¹)
MMT	12,2	20	0,007	0,391	4,622
L-HM1	15,0	9	0,039	0,193	5,293
L-HM2	15,2	6	0,004	0,454	4,366
Sepiolite	14,1	141	0,007	0,442	4,765
L-HS1	14,1	160	0,006	0,378	4,164
L-HS2	14,1	102	0,008	0,286	4,479

Os espectros infravermelho da L-histidina e de todos os materiais preparados por intercalação com a L-histidina encontram-se em anexo (Figuras A.IV 6 a A.IV.8) Na Figura V.III. 2 encontra-se o espectro da L-histidina pura e os espectros da L-histidina intercalada nas argilas. Estes espectros são o resultado da normalização dos valores de absorvância e subsequente subtração do espectro da respetiva argila de partida, de modo a obter-se apenas a absorvância de L-histidina retida nos materiais. A banda correspondente ao estiramento da ligação C-H do grupo CH₂ está presente (2900 cm⁻¹). Nesta região, as bandas são mais intensas na amostra L-HM2 (com teor de L-histidina mais elevado) do que na L-HM1 (menos concentrada em L-histidina). Entre 1600-1300 cm⁻¹, existem várias bandas estreitas mas não intensas, que correspondem a estiramento da ligação N-C e flexões da ligação C-H. Nestes materiais, as bandas correspondentes à deformação do anel da L-histidina também estão presentes (604-540 cm⁻¹). As bandas correspondentes ao estiramento da ligação N-H no anel imidazol (3300-3200 cm⁻¹) não são evidentes para amostras L-HM, embora exista estiramento da ligação C-H do anel imidazol (3000 cm⁻¹).

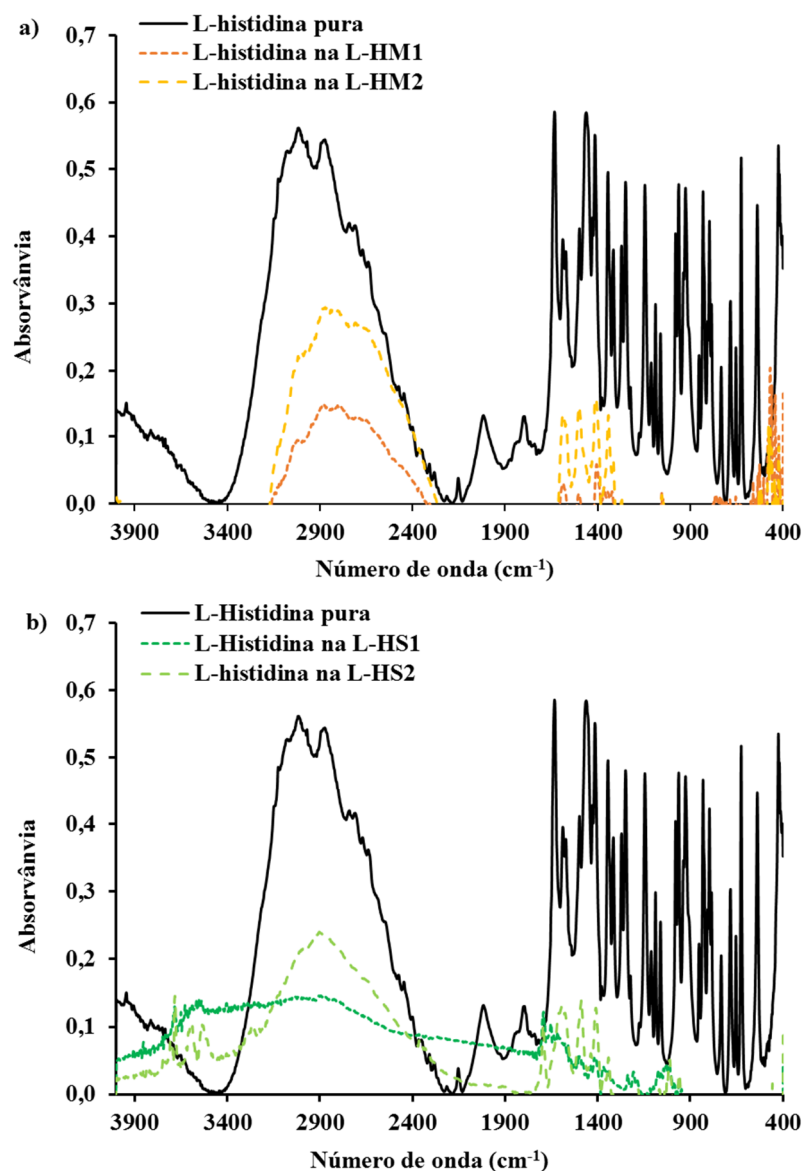


Figura V.III. 2 - Espectros de infravermelho da L-histidina pura, a) L-histidina na L-HM1 e L-HM2 e b) L-histidina na L-HS1 e L-HS2.

Os materiais preparados a partir da Sepiolite também apresentam a gama de bandas correspondente ao estiramento da ligação N-C e à flexão da ligação C-H, bem como a vibração mista de flexão das ligações $\text{NH}_3 + \text{C-H}$ a aproximadamente 1000 cm^{-1} , evidenciando a presença de L-histidina na estrutura da argila. Próximo de 2900 cm^{-1} , a banda de estiramento da ligação C-H do grupo CH_2 banda é mais intensa e fina para a amostra L-HS2 do que para a L-HS1, embora não seja tão bem definido como o foi para os materiais L-HM1 e L-HM2. Nos materiais preparados a partir da Montmorilonite, evidencia-se claramente uma ausência dos picos característicos que aparecem na argila de partida (Anexo, Figura A.IV.7) a 3600 e 3400 cm^{-1} .

Os resultados de DRX e FTIR mostraram que a L-histidina ficou retida em ambas as argilas. Para quantificar os teores retidos de L-histidina, foram realizados ensaios de TG-DSC (Figura V.III. 3a) e b)). Para a Montmorilonite, a perda de peso inicial que ocorreu entre 50 e 125 °C (cerca de 8 %), associada a um pico endotérmico, foi atribuída à perda de água fisicamente adsorvida, tendo-se mantido a sua massa aproximadamente constante até aos 600 °C. Numa primeira fase, também as amostras L-HM1 e L-HM2, apresentaram uma perda de massa correspondente à remoção da água adsorvida (cerca de 13 % e 14 %, respetivamente) que ocorreu entre 50 e 125 °C. Numa segunda etapa, ambos os materiais impregnados foram perdendo massa até ao fim do ensaio, com uma perda de massa mais acentuada para L-HM2 (aproximadamente 35 %) do que para a L-HM1 (cerca de 5 %), relativo ao teor de L-histidina em cada material. Figura V.III. 3b), a principal perda de massa ocorreu no intervalo de 50 a 300 °C para as amostras Sepiolite e L-HS2 atribuível à perda de água fisicamente adsorvida e à remoção da água zeolítica.¹⁰⁵ A amostra L-HS1 sofreu apenas desidratação na proximidade dos 100 °C, devido à remoção da água. Em adição à desidratação, as amostras L-HS1 e L-HS2 sofreram uma segunda perda de massa devido à decomposição da L-histidina presente, que correspondeu a 3 e 13 %, respetivamente. Da análise termogravimétrica estimou-se que o teor de L-histidina retido foi de 0,1 e 0,7 mmol_{L-His} / g_{MMT} para as amostras L-HM1 e L-HM2. As amostras L-HS1 e L-HS2 retiveram um teor de L-histidina de 0,02 e 0,2 mmol_{L-His} / g_{Sepiolite}, respetivamente.

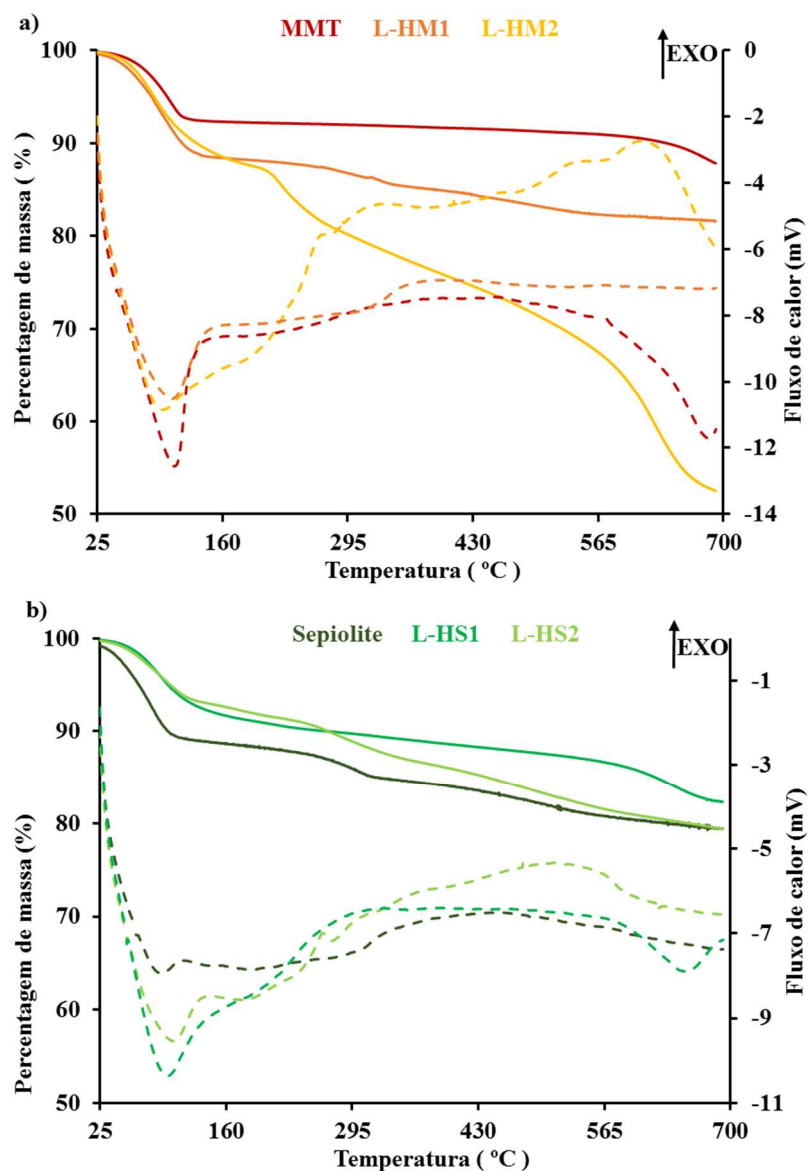


Figura V.III. 3 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas): a) Montmorilonite e respectivas amostras intercaladas com L-histidina, L-HM1 e L-HM2; b) Sepiolite e respectivas amostras intercaladas com L-histidina, L-HS1 e L-HS2.

As isotérmicas de adsorção de azoto a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentadas na Figura V.III. 4 mostram os resultados obtidos após a intercalação de L-histidina sendo que a forma das curvas é semelhante para todos os materiais, sendo do tipo IIb.⁸¹ A partir dos dados de adsorção de azoto, foi determinada a área específica BET (A_{BET}). Devido à sua morfologia e ao tamanho de partícula mais pequeno, a Sepiolite possui uma área superficial maior em comparação com a Montmorilonite e, conseqüentemente, os materiais derivados da Sepiolite apresentam também uma área mais elevada - Tabela V.III 1. No geral, a modificação das argilas com L-histidina não levou a um aumento da área específica. No caso das amostras a partir da Montmorilonite, e conforme verificado por DRX, houve uma expansão das lâminas

da argila após a intercalação com a L-histidina a qual, no entanto, terá acabado por ocupar o espaço disponível para adsorção, não resultando um aumento da área específica dessa intercalação.

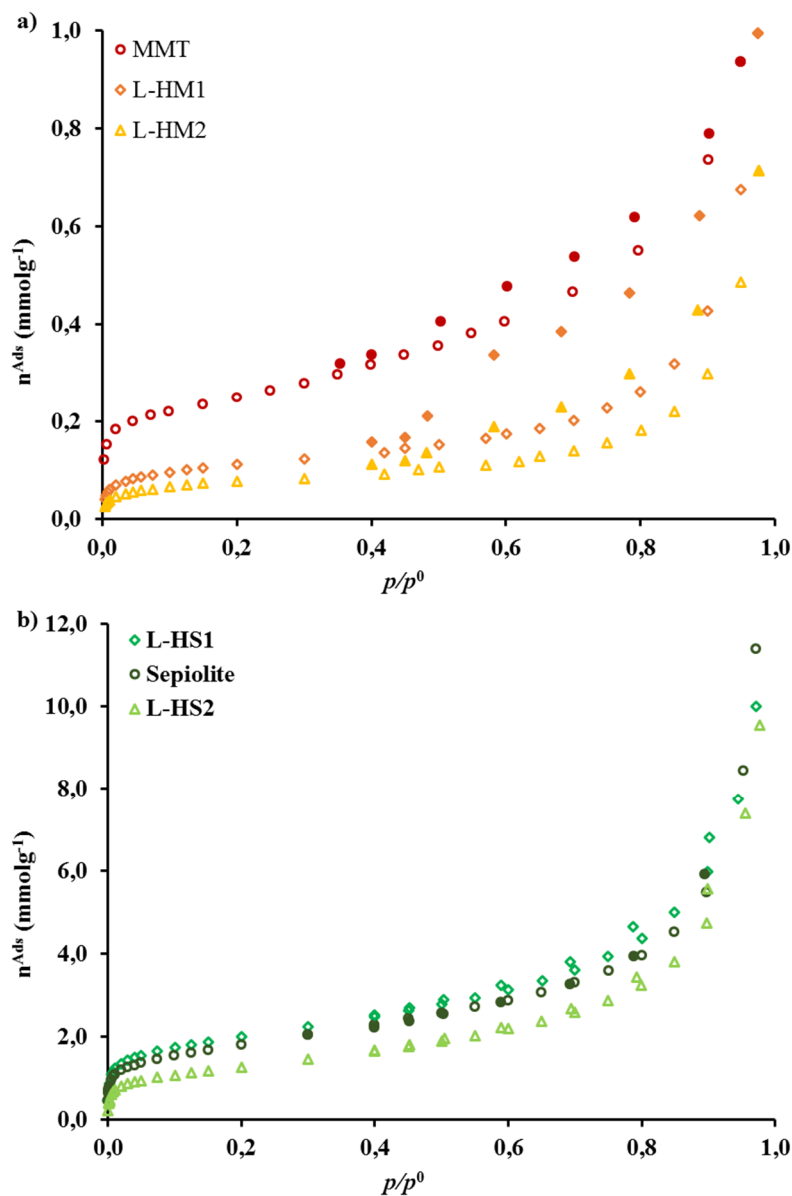


Figura V.III. 4 - Isotérmicas de adsorção de azoto a -196 °C.

Pela Figura V.III. 5 pode verificar-se que a intercalação de L-histidina nas argilas de partida originou porosidade nos materiais. As amostras obtidas da MMT (L-HM1 e L-HM2) apresentam volume poroso em toda a gama dos mesoporos. O mesmo aconteceu no caso dos materiais intercalados a partir da Sepiolite, que apresentam poros em toda a gama dos mesoporos, quando a argila de partida possuía mesoporos apenas entre 17 e 24 nm.

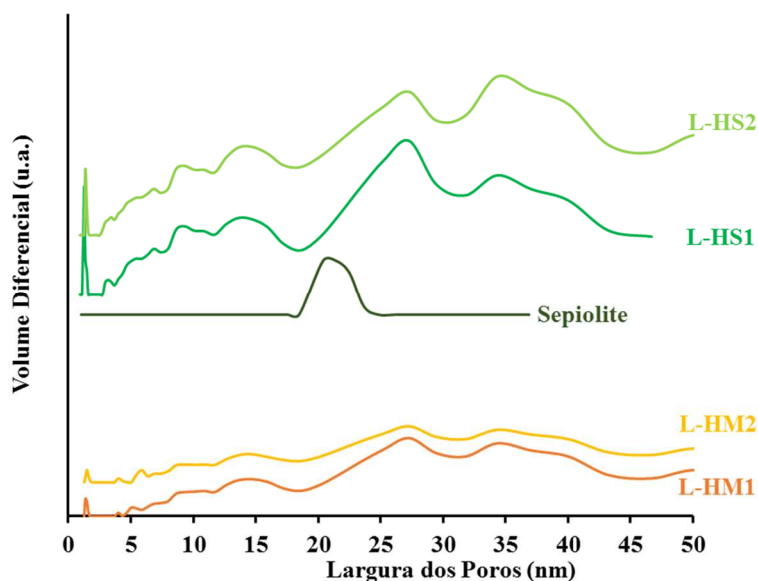


Figura V.III. 5 - Distribuição de tamanho de poros.

V.III.2 – Estudos de adsorção e de liberação de NO

V.III.2.1 – Fase gasosa

Os resultados de adsorção e de liberação de óxido nítrico encontram-se nas figuras V.III.6 e V.III.7, respetivamente. A Figura V.III. 6 mostra que, embora a área específica das amostras não tenha aumentado após modificação das argilas com L-histidina, como discutido acima, as “organoclays” aumentaram significativamente a sua capacidade de adsorção de óxido nítrico - Tabela V.III 2. No que se refere às argilas de partida, a argila Sepiolite adsorveu um maior teor de NO comparativamente com a argila montmorillonite. Em geral, na fase inicial a adsorção foi mais rápida tornando-se depois mais lenta ao longo do tempo. A amostra L-HM2 destacou-se das demais amostras pois exibiu uma cinética de adsorção mais lenta quase desde o início do ensaio, permanecendo aproximadamente linear com o tempo. O teor de NO adsorvido foi próximo dos teores adsorvidos pelas amostras L-HM1 e L-HS1 (cerca de 3 %). A amostra L-HS2 foi a que maior teor de NO adsorveu (cerca de 4 % NO).

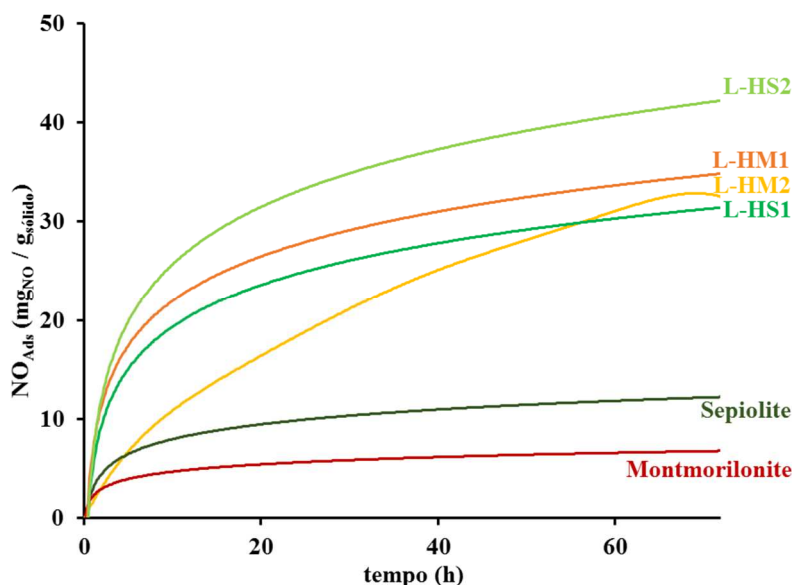


Figura V.III. 6 - Adsorção de NO em fase gasosa (a 25 °C).

Tabela V.III 2 - Adsorção e liberação de NO em fase gasosa.

Material	%NO _{Ads} ^a	NO _{Ads} ^b	NO _{Lib} ^c	NO _{Lib} ^d
MMT	0,7	7,2	2,1	2,8
L-HM1	3,6	35,8	8,0	13,2
L-HM2	3,4	33,7	8,1	14,2
Sepiolite	1,3	12,8	7,5	8,4
L-HS1	3,4	34,4	6,7	10,7
L-HS2	4,4	44,4	6,9	10,2

^a máximo de NO adsorvido na fase gasosa, ^b máximo de NO adsorvido na fase gasosa (mgNO g_{sólido}⁻¹), ^c NO libertado ao fim de 2h (mgNO g_{sólido}⁻¹) em fase gasosa, ^d NO libertado em fase gasosa ao fim de 20 h (mgNO g_{sólido}⁻¹)

As curvas de liberação de óxido nítrico -Figura V.III. 7- mostram que a liberação foi mais rápida durante as primeiras duas horas. A Sepiolite destaca-se dos outros materiais por ser a que libertou uma quantidade mais elevada de NO (65%), ao passo que todos os outros sólidos libertaram menos de 40 % do NO adsorvido, sendo a amostra L-HM2 o melhor caso a amostra. O material L-HS2, que maior ter de NO adsorveu, foi no entanto, aquele que menos NO libertou (apenas 23 % dos 44 mgNO g_{sólido}⁻¹ adsorvidos). Em resumo, mesmo que a quantidade de NO adsorvido seja elevada, em última instância a quantidade libertada e o perfil de liberação serão fortemente determinantes na viabilidade de um material como transportador de NO. Neste sentido, e considerando apenas os resultados a partir da fase gasosa, as amostras de Montmorilonite intercaladas com L-histidina (L-HM1 e L-HM2) para

além de terem adsorvido elevados teores de NO, foram as que libertaram também as maiores quantidades de NO. No entanto, se se tiver em conta a possível formação de adutos de NO por reação com L-histidina, estes poderão ser suficientemente estáveis para não se decomporem e libertarem NO apenas sob vácuo. Assim, os resultados obtidos na fase líquida, apresentados mais à frente, serão mais representativos do potencial dos materiais relativamente à libertação de NO.

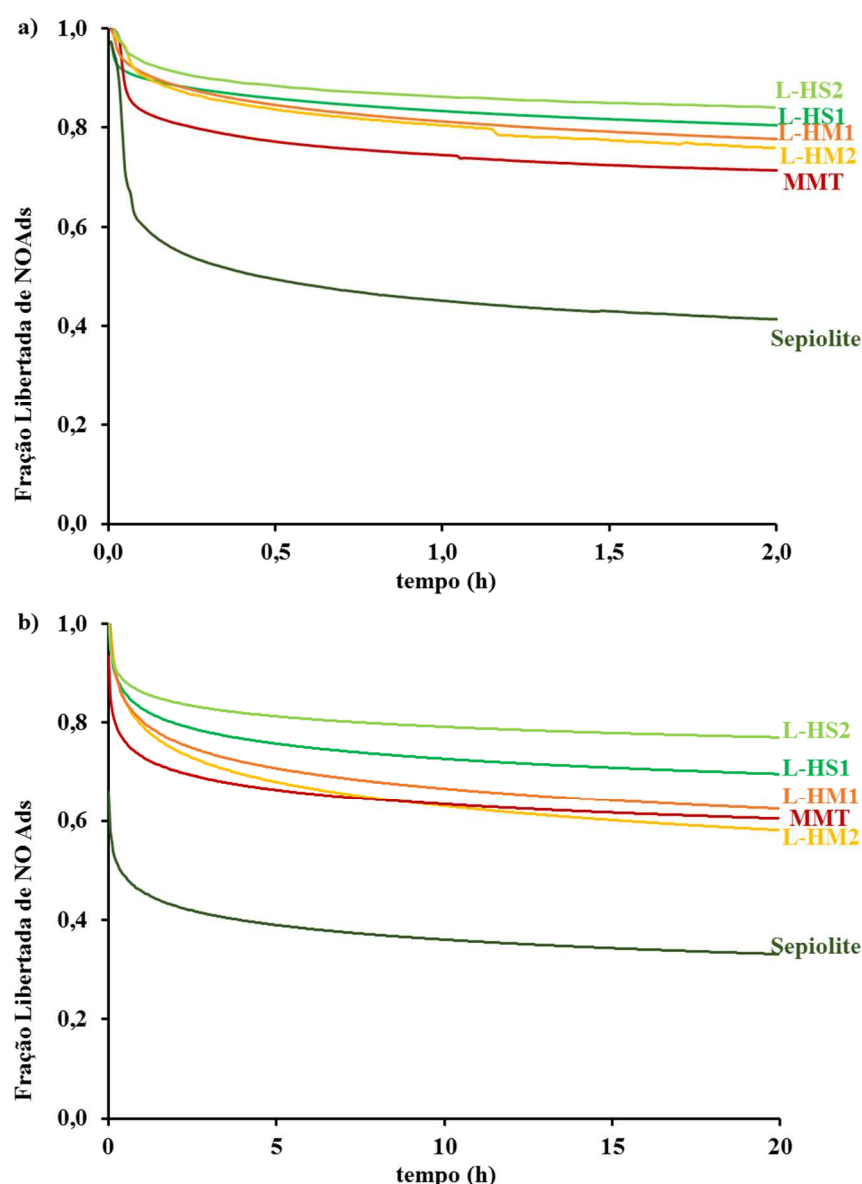


Figura V.III. 7- Libertação de NO na fase gasosa (a 25 °C). a) ao fim de 2h; b) ao fim de 20 h.

O modelo que melhor se ajusta às curvas da cinética de libertação de NO, de acordo com o método AIC, é o de Korsmeyer-Peppas (Equação V.I.2) - Figura V.III. 8.

Compararam-se os resultados experimentais (pontos) com os obtidos da aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas (linhas contínuas). Os parâmetros de ajuste encontram-se na Tabela V.III 3, verificando-se que a cinética de libertação de NO é mais rápida nas argilas de partida, em particular na Sepiolite. Verificou-se também que os materiais derivados da Montmorilonite apresentaram uma cinética de libertação mais lenta comparativamente com os derivados da Sepiolite, e foram também (como explicado anteriormente) os que retiveram maiores quantidades de L-histidina. De salientar ainda que os materiais mais concentrados em L-histidina, foram os que apresentaram as cinéticas de libertação mais lentas dentro da sua família de materiais.

Tabela V.III 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a libertação em fase gasosa.

Material	<i>Fase Gasosa</i>	
	<i>k</i>	<i>n</i>
MMT	0,371 ± 0,009	0,214 ± 0,006
L-HM1	0,245 ± 0,003	0,299 ± 0,003
L-HM2	0,173 ± 0,005	0,375 ± 0,007
Sepiolite	0,477 ± 0,011	0,162 ± 0,006
L-HS1	0,329 ± 0,002	0,233 ± 0,001
L-HS2	0,259 ± 0,011	0,293 ± 0,010

k, constante cinética da equação de Korsmeyer-Peppas (min⁻ⁿ); *n*, expoente de libertação.

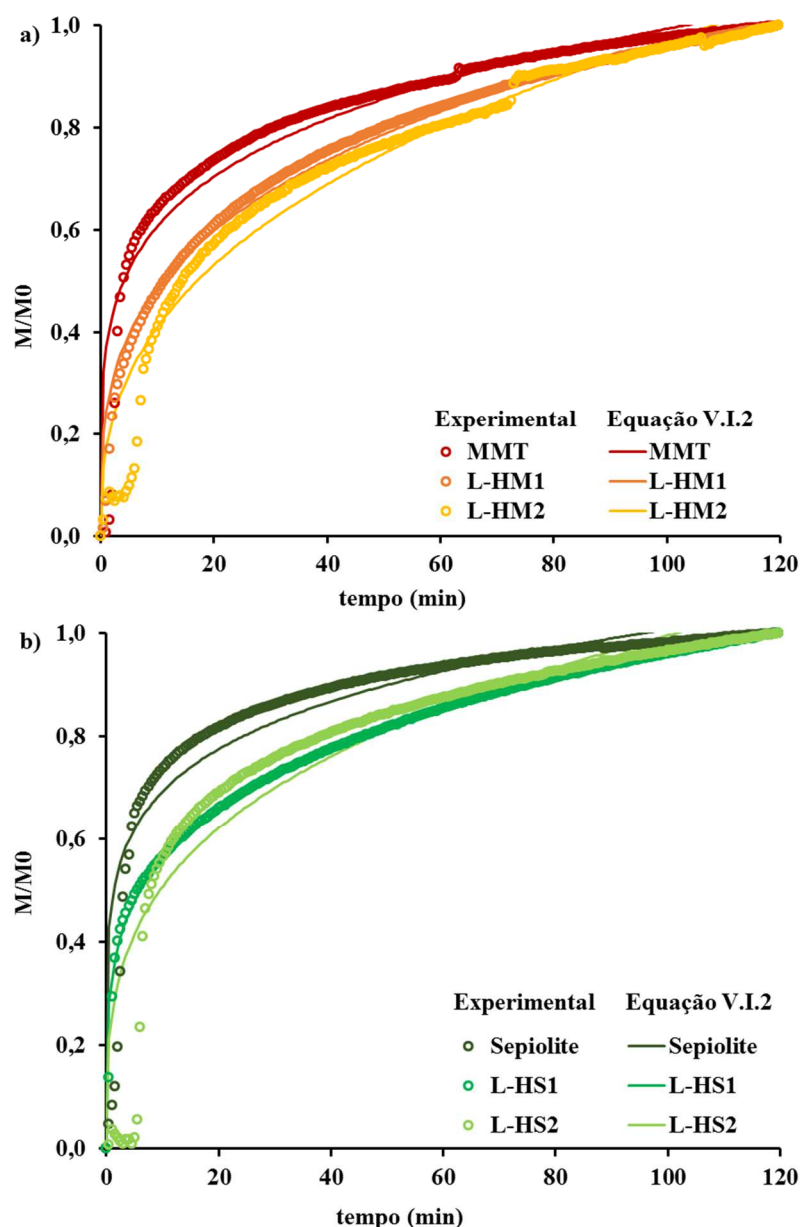


Figura V.III. 8 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase gasosa.

V.II.2.2 – Fase líquida

Os estudos de libertação de óxido nítrico foram realizados em fase líquida, usando o método da oxi-hemoglobina⁸⁶, como descrito na parte experimental (secção IV.3). Na Figura V.III. 9 podem observar-se os espectros da solução de oxiHb e metHb após libertação de NO nas argilas intercaladas com L-histidina. Os espectros relativos à transformação de oxiHb em metHb após contacto com a MMT e a Sepiolite carregadas com NO encontram-se na Figura A.IV.1 em anexo e Figura V.II. 8, respetivamente. Como se pode observar na figura abaixo, todos os materiais libertaram NO, visto ter havido transformação da oxiHb inicial em metHb.

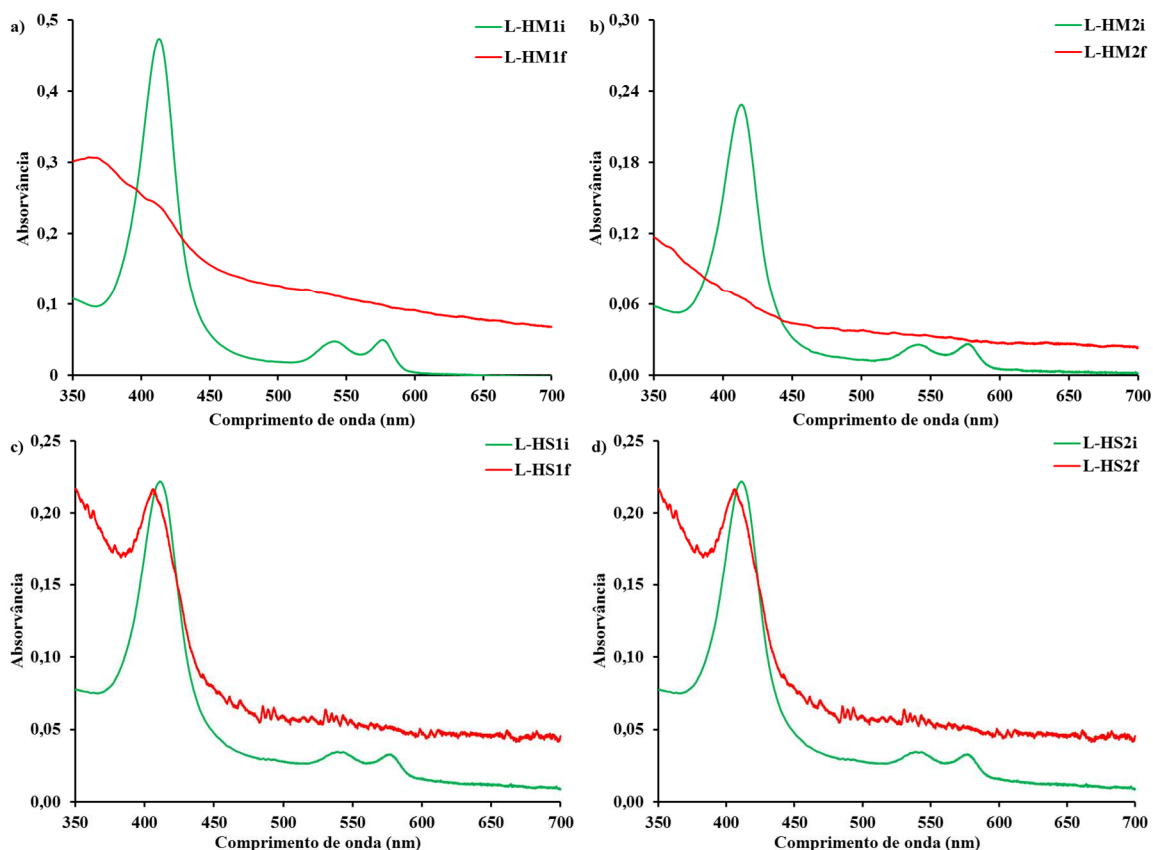


Figura V.III. 9 – Espectros de UV-Vis da hemoglobina inicial e final após 2h de ensaio de libertação de NO. Comparação entre: os materiais de Montmorilonite intercalada com L-histidina: a) L-HM1, b) L-HM2; e os materiais de Sepiolite intercalada com L-histidina c) L-HS1, d) L-HS2

Os resultados na forma de concentração de NO *versus* tempo encontram-se apresentados na Figura V.III. 10 e na Tabela V.III 4. Em contraste com os outros materiais, L-HM1 foi o material que libertou mais NO, e, adicionalmente, exibiu um perfil de libertação relativamente linear. Os materiais L-HS1 e Sepiolite mostraram também uma certa linearidade no perfil de libertação, no entanto o montante total de NO libertação foi menor do que para o material L-HM1. Os restantes materiais libertaram menos NO atingindo um patamar após a primeira meia hora. Curioso também foi o facto de que as “organoclays” com menor teor de L-histidina terem sido as que apresentaram um melhor comportamento relativamente à libertação de óxido nítrico.

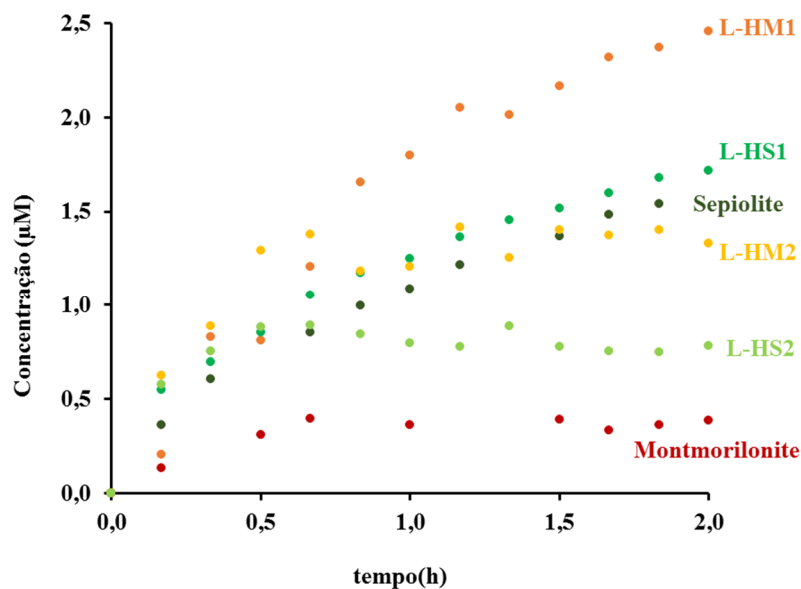


Figura V.III. 10- Liberação de NO em fase líquida em função do tempo.

Tabela V.III 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.

Material	[NO] (µM)	[NO] (µM/g _{material})	mNO (µgNO/g _{material})
MMT	0,4	89	8
L-HM1	2,5	556	50
L-HM2	1,4	311	28
Sepiolite	1,5	333	30
L-HS1	1,7	378	34
L-HS2	0,9	200	18

Aos resultados da cinética de liberação de NO em fase líquida, foram aplicados os modelos matemáticos anteriormente descritos (Equação V.I.1 a Equação V.I.3). A fração de NO libertada frente ao tempo e os ajustes pelo respetivo modelo cinético encontram-se na Figura V.III. 11.

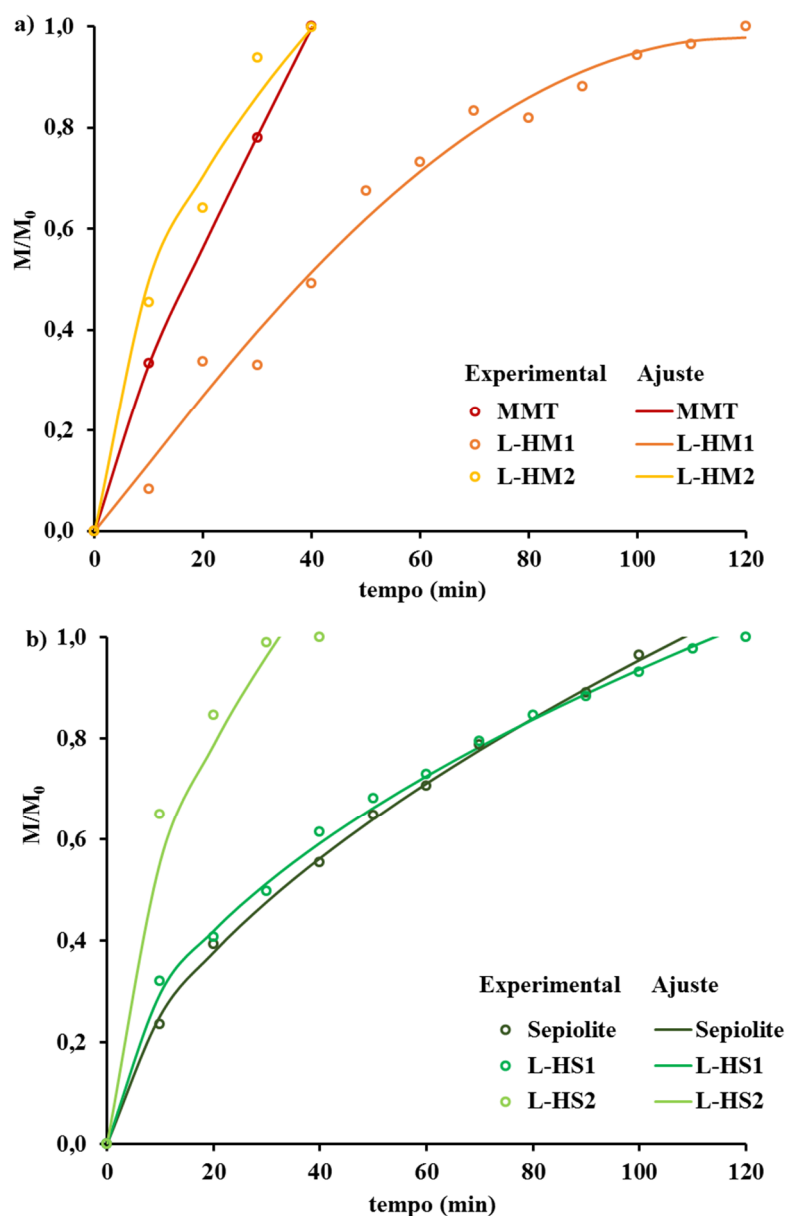


Figura V.III. 11 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase líquida. a) MMT e materiais derivados b) Sepiolite e materiais derivados.

Em fase líquida a Montmorilonite de partida (MMT) atingiu um máximo de libertação de NO ao fim de cerca de 40 min. Da aplicação dos modelos cinéticos o que melhor se ajusta é o de Peppas-Sahlin, significando assim que esta argila liberta NO segundo dois mecanismos: difusão e expansão. Neste caso o mecanismo predominante foi o de difusão ($k_d > k_r$) - Tabela V.III 5 - embora a interação da argila com o meio de libertação possa de facto ter contribuído para a expansão da mesma. No caso da Sepiolite isso não aconteceu, pois esta possui uma estrutura mais rígida não sendo tão passível de expandir. O mecanismo de libertação de NO na Sepiolite seguiu o modelo de Korsmeyer-Peppas, sendo a libertação essencialmente Fickiana. O mesmo ocorreu na amostra L-HM1, embora o

coeficiente de libertação indique a ocorrência de uma libertação anômala o mecanismo de libertação ocorreu predominantemente por difusão, seguindo o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Tabela V.III 5 - Resultados da aplicação dos modelos cinéticos para a libertação de NO em fase líquida.

Material	Peppas-Sahlin		
	k _d	k _r	n
MMT	0,063 ± 0,004	0,005 ± 0,003	0,605 ± 0,126
	Korsmeyer-Peppas		
	k	n	
L-HM1	0,043 ± 0,012	0,671 ± 0,061	
Sepiolite	0,067 ± 0,003	0,578 ± 0,011	
	Higushi		
	k		
L-HM2	0,158 ± 0,008		
L-HS1	0,094 ± 0,001		
L-HS2	0,176 ± 0,008		

k_d , constante cinética de difusão da equação de Peppas-Sahlin (min^{-n}); k_r , constante cinética de relaxação da equação de Peppas-Sahlin (min^{-2n}); k , constante cinética de difusão da equação de Korsmeyer (min^{-n}); n , expoente de libertação.

As no caso das amostras, L-HM2, L-HS1 e L-HS2 o modelo de libertação de NO que mais se lhes aplica é o de Higushi (mecanismo essencialmente Fickiano).

V.III.3 – Conclusão

As “organoclays” foram preparadas pela modificação de minerais de argila, Montmorilonite e Sepiolite, com L-histidina. Os resultados obtidos confirmaram a incorporação de L-histidina na estrutura das argilas. As quantidades de L-histidina intercalada foram mais elevadas para os materiais de Montmorilonite do que de Sepiolite, justificando-se em termos das diferenças estruturais entre ambos os minerais de argila, ou seja, a possibilidade de expansão da montmorillonite.

Em relação às argilas de partida, observou-se uma melhoria quer nos teores quer no perfil de libertação de NO nas “organoclays”, em particular para as amostras com a menor

quantidade de L-histidina incorporada. Esta melhoria esteve provavelmente relacionada com as interações específicas de NO com os grupos -NH da L-histidina, que foram descritos na literatura para outros compostos.^{13, 29} As quantidades de NO armazenado e libertado nas “organoclays” preparadas, encontram-se dentro da gama dos relatados para minerais de argila modificados com espécies inorgânicas, por exemplo, argilas com pilares.

No entanto, as “organoclays” descritas acima, particularmente aquelas preparadas a partir da Montmorilonite, são compostas por substâncias (Montmorilonite e L-histidina), que são atualmente utilizadas em medicina, embora separadamente. Tal facto poderá ser uma vantagem para a aprovação deste tipo de materiais como portadores de NO em aplicações terapêuticas.^{12, 28}

Tendo em conta os resultados interessantes obtidos com as amostras contendo quantidades menores de L-histidina, estes materiais foram selecionados para efetuar estudos de toxicidade com células HeLa, tendo-se também usado as argilas de partida como controlo.

V.IV – Argilas Sintéticas

V.IV.1 – Caracterização dos materiais

Dado que as argilas naturais não possuem na sua estrutura uma grande variedade de metais de transição e que, de acordo com a literatura⁷¹, os íons cobalto poderão ter afinidade para a adsorção de NO, tentou-se sintetizar uma esmectite com cobalto na sua estrutura. Prepararam-se então três materiais, CoAS-A e CoAS-B (usando ácido silícico como fonte de sílica mas preparados por duas vias diferentes) e CoOS (usando TMOS como fonte de silício) – secção IV.1.4.

Para confirmar a formação de uma argila do tipo esmectite, as amostras obtidas foram caracterizadas por DRX, e comparadas com a Montmorilonite natural que se tem vindo a estudar neste trabalho, encontrando-se os resultados na Figura V.IV. 1.

A Montmorilonite (MMT) apresenta um pico estreito e bastante intenso na proximidade dos 7 ° de 2 θ que corresponde a um espaçamento basal característico, d_{001} , de 12 Å.⁹⁰ Os picos para valores próximos de 20, 22, 27, 28 e 35 ° de 2 θ podem também ser identificados como sendo reflexões características da MMT.^{90, 91} No caso dos materiais sintetizados, a identificação dos picos não é tão clara como na MMT, provavelmente por apresentarem uma estrutura mais desordenada e/ou, como se focará mais à frente, por as dimensões das partículas dos materiais sintetizados serem inferiores às da MMT. No entanto, é possível observarem-se as principais reflexões, características de uma argila do tipo esmectite, Figura V.IV. 1 a). Pode ainda identificar-se em todos os materiais a reflexão característica correspondente ao espaçamento basal d_{001} - Figura V.IV. 1 b). Os valores correspondentes ao espaçamento basal, que ocorre no intervalo de 7 a 8 ° de 2 θ , encontram-se na Tabela V.IV. 1

Tabela V.IV. 1 - Parâmetros texturais onde, d_{001} é o espaçamento basal, A_{BET} é a área superficial, V_{μ} é o volume microporoso, V_m é o volume mesoporoso, E_0 é o parâmetro energético da equação DA.

Material	d_{001} (Å)	A_{BET} (m ² g ⁻¹)	V_{μ} (cm ³ g ⁻¹)	V_m (cm ³ g ⁻¹)	E_0 (kJmol ⁻¹)
MMT	12,6	20	0,007	0,391	4,622
CoAS-A	14,2	218	0,066	0,084	5,709
CoOS	11,9	246	0,035	0,125	5,220
CoAS-B	13,0	41	0,000	0,093	4,560

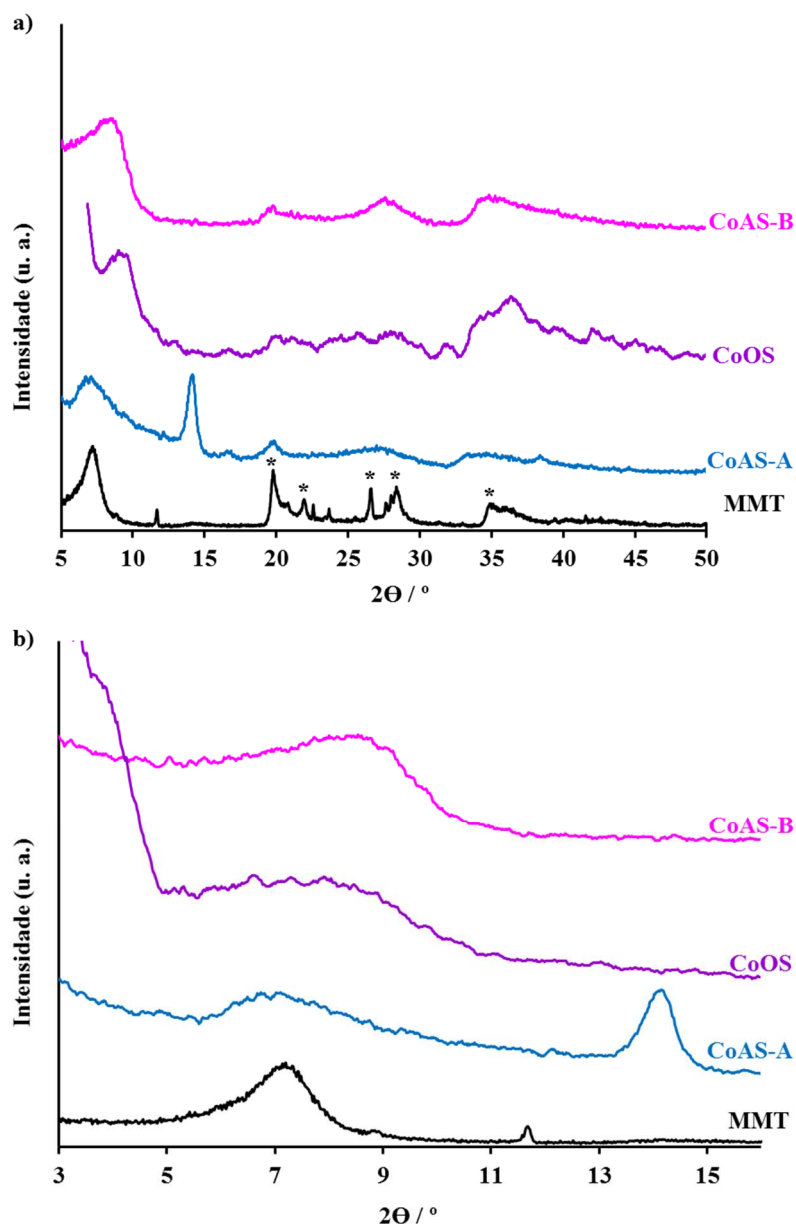


Figura V.IV. 1 - Difractogramas de raios X da Montmorilonite natural e dos materiais sintéticos. a) Intervalo de 2θ mais largo, b) intervalo de 2θ até 18° .

Para confirmar que os materiais sintetizados são esmectites usou-se o teste do etilenoglicol (ETG)¹⁰⁹ de modo a verificar a existência de expansão - Figura V.IV. 2.

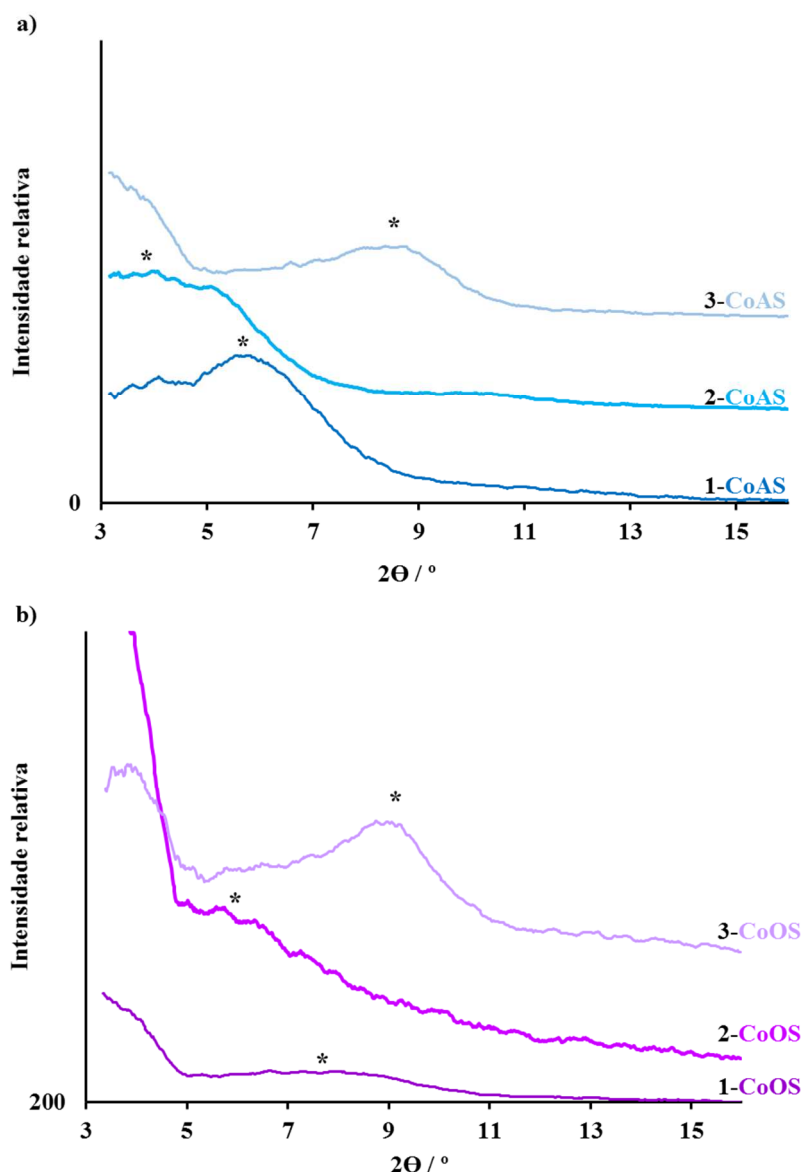


Figura V.IV. 2 – Teste do etilenoglicol. Difractogramas de raios-X: a) CoAS-A e b) CoOS (1-amostra de partida, 2-amostra com etilenoglicol, 3- amostra sem etilenoglicol, após aquecimento a 300 °C).

Como se pode observar na Figura V.IV. 2, após contacto o ETG a reflexão correspondente ao espaçamento basal, de ambas as amostras, sofreu um desvio para valores mais baixos de 2θ , indicando que a argila expandiu. Posteriormente, após aquecimento a 300 °C, voltou a ocorrer desvio correspondente ao d_{001} , desta vez para valores mais elevados de 2θ . Este teste mostrou que, tal como as esmectites, as argilas sintetizadas apresentam a expansibilidade característica das esmectites.

Os resultados da caracterização por TG-DSC encontram-se na Figura V.IV. 3. A maior de perda de massa ocorreu entre os 50 e 125 °C para todas as amostras, cerca de 15 % para a Montmorilonite e 5 % para os restantes materiais. Esta perda inicial de massa correspondeu

à perda de água que está fisicamente adsorvida. Após a perda inicial, a MMT, assim como a amostra CoAS-A, manteve a sua massa aproximadamente constante até aos 600 °C. Até esta temperatura, o material CoOS perdeu cerca de 10 % de massa.

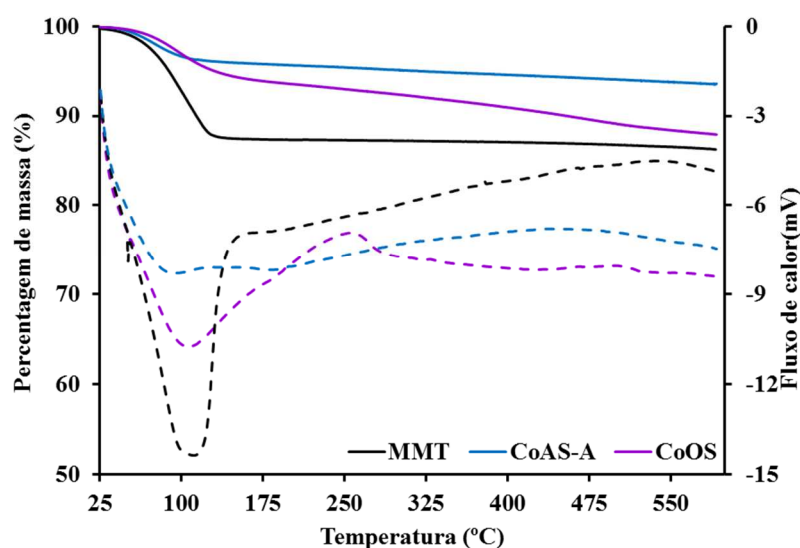


Figura V.IV. 3 - TG (linhas sólidas) e DSC (linhas tracejadas): Montmorilonite e argilas sintéticas.

O teor de íões cobalto presente nas amostras preparadas foi quantificado por EAA. A amostra preparada com TMOS apresentou um teor de 9 % de íões cobalto, consideravelmente inferior ao das amostras preparadas com ácido silícico, que conduziu a teores de 22 e 30 % para CoAS-A e CoAS-B, respetivamente.

Na Figura V.IV. 4 encontram-se os espectros de infravermelho da Montmorilonite e dos materiais sintetizados. Para a Montmorilonite podem observar-se as bandas características de um silicato: as vibrações de estiramento do grupo Si-O-Si ocorrem entre 1027 e 1091 cm^{-1} ; na região entre 400 e 800 cm^{-1} observam-se várias vibrações que correspondem ao estiramento das ligações dos grupos Si-O-M (M = alumínio, magnésio e outros metais presentes na argila). Para além disso, observa-se ainda uma banda próxima de 3625 cm^{-1} atribuída às vibrações de estiramento dos grupos -OH. A aproximadamente 3434 cm^{-1} observam-se vibrações de estiramento do grupo -OH referente à água adsorvida e a 1621 cm^{-1} as correspondentes vibrações de deformação da água adsorvida.

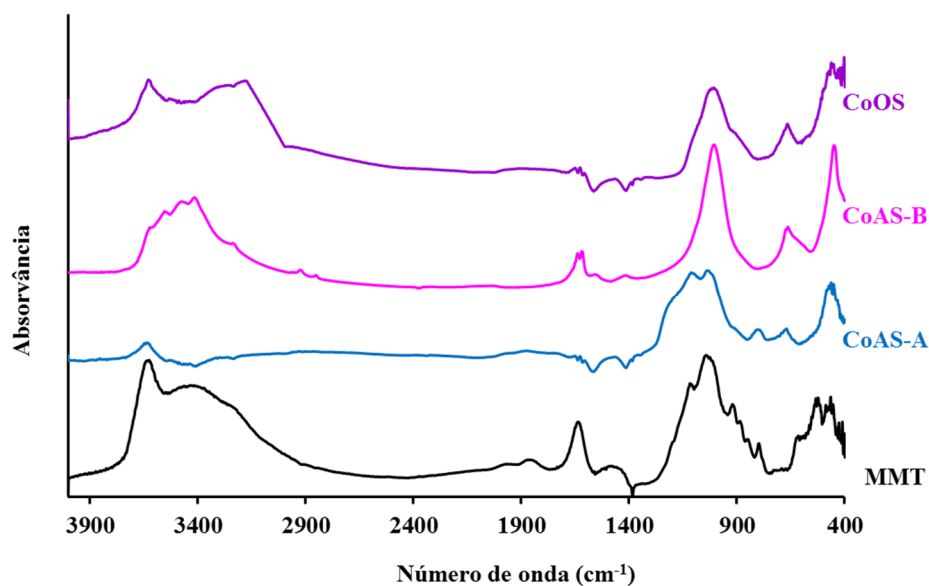


Figura V.IV. 4 - Espectros de IV da Montmorilonite (MMT) e dos materiais preparados (CoAS-A, CoAS-B e CoOS).

No caso dos materiais sintetizados, todos apresentam as vibrações de estiramento da ligação Si-O-Si, embora numa amostra esta banda seja mais intensa que noutras. Todas as amostras apresentam também bandas correspondentes às vibrações Si-O-M que poderão corresponder, neste caso, às ligações com os iões cobalto. As vibrações correspondentes ao estiramento dos grupos -OH parecem também estar presentes assim como as vibrações típicas do estiramento e deformação dos grupos -OH da água adsorvida (exceto para a amostra CoAS-A, na qual não é evidente a vibração correspondente ao estiramento).

Os resultados da caracterização efetuada por DRX, TG-DSC e IV para os materiais sintetizados são assim compatíveis com a existência de materiais argilosos expansíveis do tipo Montmorilonite.

A Figura V.IV. 5 ilustra os resultados da adsorção de azoto nos materiais sintetizados sendo incluída, para comparação, a isotérmica de adsorção na Montmorilonite.

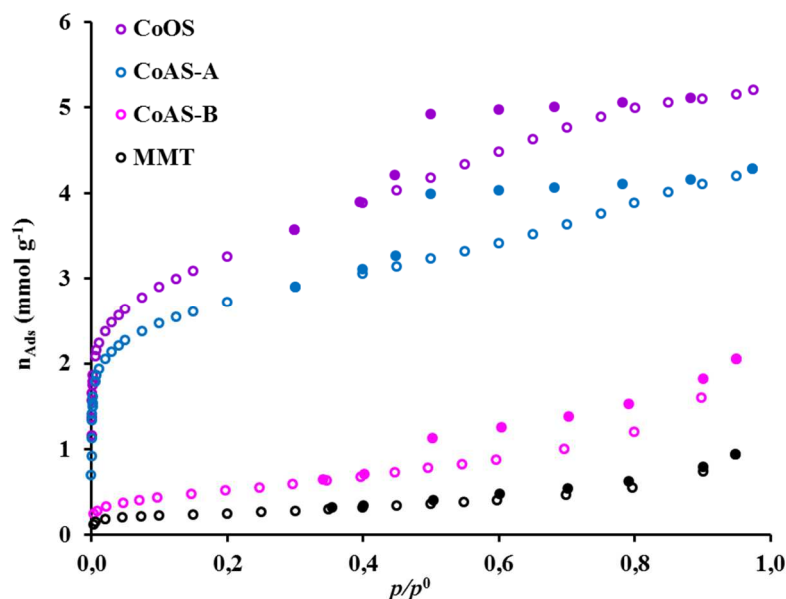


Figura V.IV. 5 - Isotérmicas de adsorção de azoto a -196 °C.

A amostra CoAS-B, tal como a MMT, apresenta uma isotérmica do tipo IIb, usual em argilas naturais, as quais são materiais não porosos compostos por agregados de partículas lamelares. Os restantes materiais apresentam isotérmicas semelhantes entre si com características mistas do tipo I e IV.^{51, 81} A sua A_{BET} é bastante superior à das amostras MMT e CoAS-B - Tabela V.IV. 1 – pois são os materiais que apresentam microporosidade.

A partir dos dados da Figura V.IV. 5 foram determinadas as distribuições de tamanhos de poros pelo método DFT - Figura V.IV. 6. Ao contrário da Montmorilonite (material não poroso), os materiais CoAS-A e CoOS apresentam microporosidade, com poros de largura na ordem dos 1,5 nm, e também mesoporosidade com largura de poros num intervalo de 2 a 10 nm. O material CoAS-B, por seu lado, é essencialmente mesoporoso (com tamanho de poros num intervalo de 5 a 10 nm).

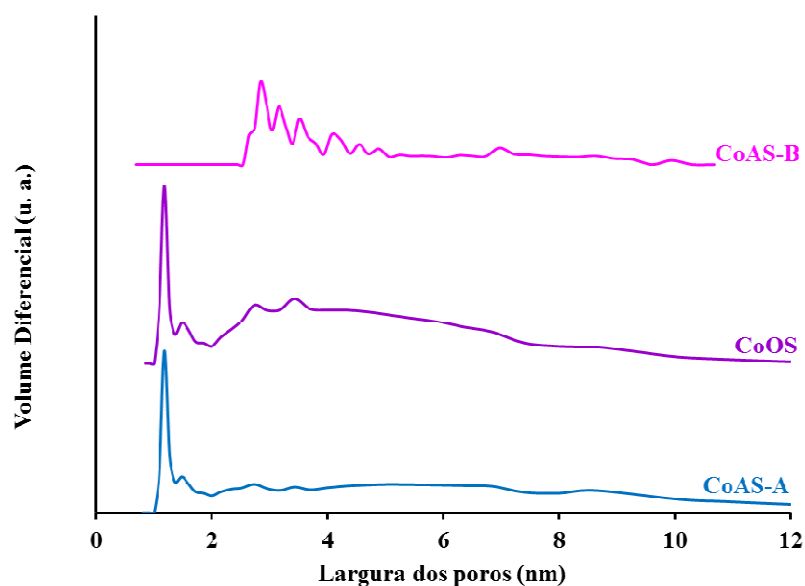


Figura V.IV. 6 - Distribuição de tamanho de poros.

Recorreu-se à MEV para verificar a morfologia dos cristalitos dos materiais obtidos. Pela Figura V.IV. 7 a) pode observar-se que a amostra CoAS-A possui partículas de dimensões bastante reduzidas, não tendo sido possível visualizar uma partícula independente, esta amostra parece ser constituída por agregados de partículas. Já na Figura V.IV. 7 b) pode observar-se uma estrutura lamelar mais típica das argilas.

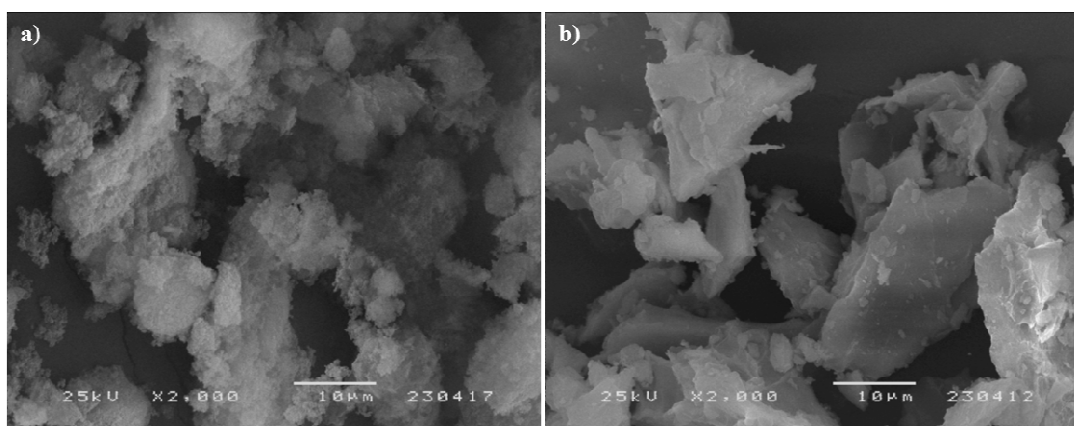


Figura V.IV. 7 - Micrografias, obtidas por MEV, das amostras: a) CoAS-A e b) CoOS.

Determinou-se o tamanho de partículas das amostras sintetizadas, por DLS, os resultados encontram-se na Figura V.IV. 8. Realça-se que na análise por DLS se considera que as partículas têm uma forma esférica, pelo que os resultados nos materiais aqui estudados

têm de ser interpretados com as devidas reservas, admitindo-se no entanto a análise comparativa que foi realizada entre os vários materiais. Assim, na Figura V.IV. 8 observa-se que o material CoOS apresenta partículas de dimensões entre 100 a 250 nm, no entanto, em média, o seu tamanho de partículas ronda os 200 nm. A amostra CoAS-A apresenta um tamanho médio de partículas de cerca de 400 nm, apresenta ainda partículas com tamanho entre 1500 a 2500 nm, no entanto, estes valores são, muito provavelmente, consequência de agregação de partículas. O material CoAS-B apresenta maioritariamente partículas com tamanho entre 100 a 450 nm, sendo o seu tamanho médio de partícula muito semelhante à amostra CoOS. Esta amostra, no entanto, também tem tendência a formar agregados, com tamanhos entre 500 e 1000 nm, aproximadamente. Os tamanhos médios de partículas dos materiais sintetizados são próximos entre si, sendo consideravelmente inferiores ao da argila natural Montmorilonite (bem como da Sepiolite - Figura V.IV. 8).

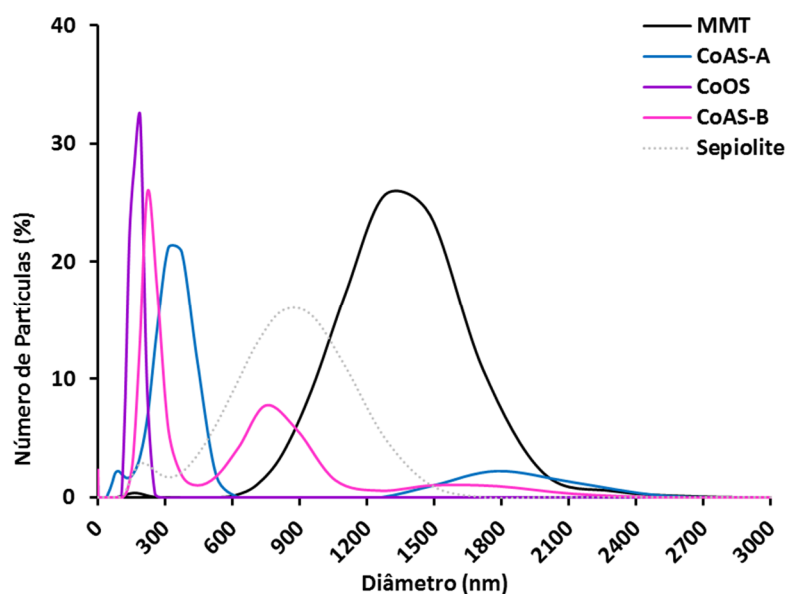


Figura V.IV. 8 - Tamanho de partículas das amostras MMT, CoAS-A, CoOS, e CoAS-B determinado por DLS.

V.IV.2 – Estudos de adsorção e de libertação de NO

V.IV.2.1 – Fase gasosa

Os resultados de adsorção e de libertação de óxido nítrico encontram-se nas Figuras V.IV.9 e V.IV.10, respetivamente.

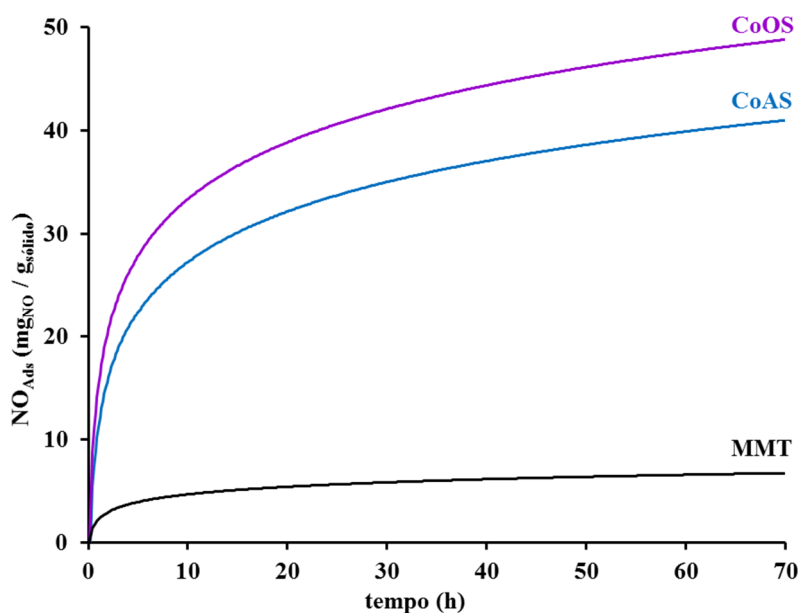


Figura V.IV. 9 - Adsorção de NO em fase gasosa (a 25 °C).

A Figura V.IV. 9 mostra que as argilas sintéticas adsorvem uma quantidade de NO muito superior à Montmorilonite - Tabela V.IV. 2. Os teores de NO adsorvido, para estas amostras, encontram-se entre 4,5 e 5,1 % em massa. A cinética de adsorção registrada para as amostras sintetizadas foi mais rápida inicialmente, tornando-se mais lenta com o decorrer do tempo.

Tabela V.IV. 2 - Adsorção e liberação de NO em fase gasosa.

Material	%NO _{Ads} ^a	NO _{Ads} ^b	NO _{Lib} ^c	NO _{Lib} ^d
MMT	0,7	7,2	2,1	2,8
CoAS-A	4,5	45,0	8,0	13,2
CoOS	5,1	50,9	6,9	10,2

^a máximo de NO adsorvido na fase gasosa, ^b máximo de NO adsorvido na fase gasosa (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹), ^c NO libertado ao fim de 2h (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹) em fase gasosa, ^d NO libertado em fase gasosa ao fim de 20 h (mg_{NO} g_{sólido}⁻¹)

No que diz respeito à liberação de NO, como pode ser observado na Figura V.IV. 10, as amostras libertam aproximadamente entre 30 a 40 % do teor adsorvido. A liberação de NO na Montmorilonite ocorre nas 2 primeiras horas de ensaio, até às 20 h de ensaio a liberação de NO é meramente residual. A cinética de liberação de NO nos materiais CoAS-

A e CoOS também é mais rápida na fase inicial, 60 % do teor de NO libertado ocorre durante as 2 primeiras horas de ensaio.

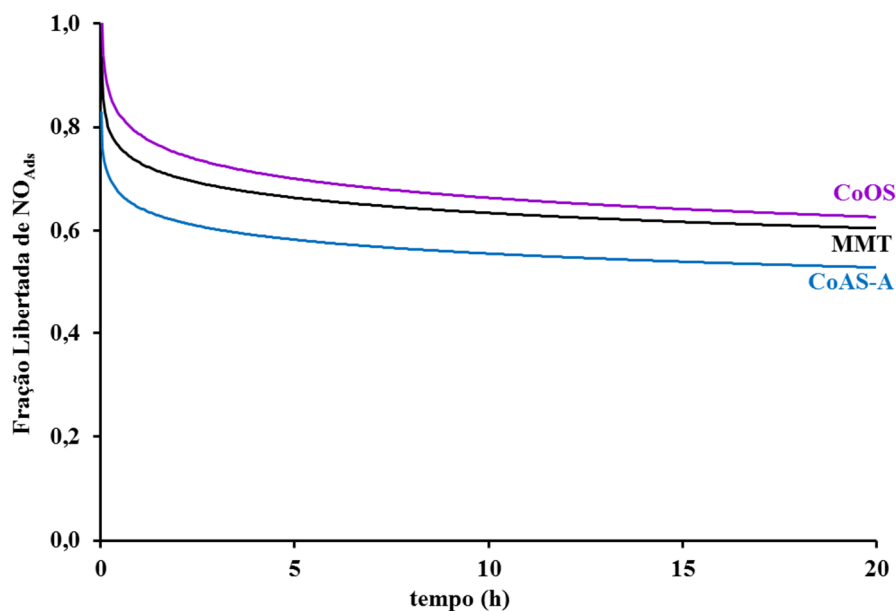


Figura V.IV. 10 - Liberação de NO na fase gasosa (a 25 °C).

Dos modelos cinéticos estudados o que mais se ajusta é o de Korsmeyer-Peppas (Equação V.I.2) -Figura V.IV. 11.

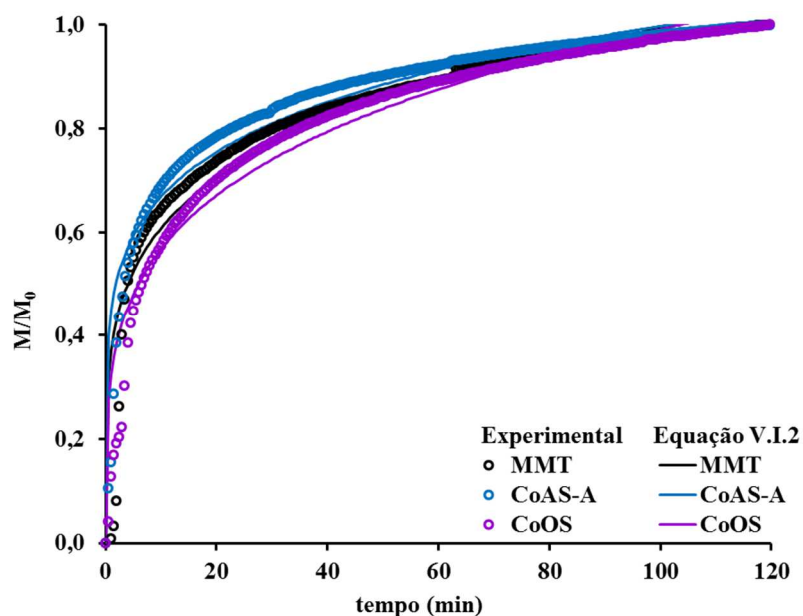


Figura V.IV. 11 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase gasosa.

Compararam-se os resultados experimentais (pontos) com os obtidos da aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas (linhas contínuas). Os parâmetros de ajuste encontram-se na

Tabela V.IV. 3, verificando-se que a cinética de libertação de NO é muito similar em todos os materiais, sendo que as argilas sintéticas apresentam a cinética mais rápida (CoAS-A) e também a mais lenta (CoOS).

Tabela V.IV. 3 - Resultados da equação de Korsmeyer-Peppas para a libertação em fase gasosa.

Material	<i>Fase Gasosa</i>	
	<i>k</i>	<i>n</i>
MMT	0,371 ± 0,009	0,214 ± 0,006
CoAS-A	0,449 ± 0,007	0,174 ± 0,004
CoOS	0,325 ± 0,006	0,242 ± 0,005

k, constante cinética da equação de Korsmeyer-Peppas (min⁻ⁿ); *n*, expoente de libertação.

V.II.2.2 – Fase líquida

Na Figura V.IV. 12 podem observar-se os espectros da solução de oxiHb e metHb após libertação de NO nas argilas sintéticas. Como se pode observar na Figura V.IV. 12, todos os materiais libertaram NO, visto ter havido transformação da oxiHb inicial em metHb. Qualitativamente, na amostra CoAS-A a diferença entre os dois espectros, inicial e final, não foi muito acentuada.

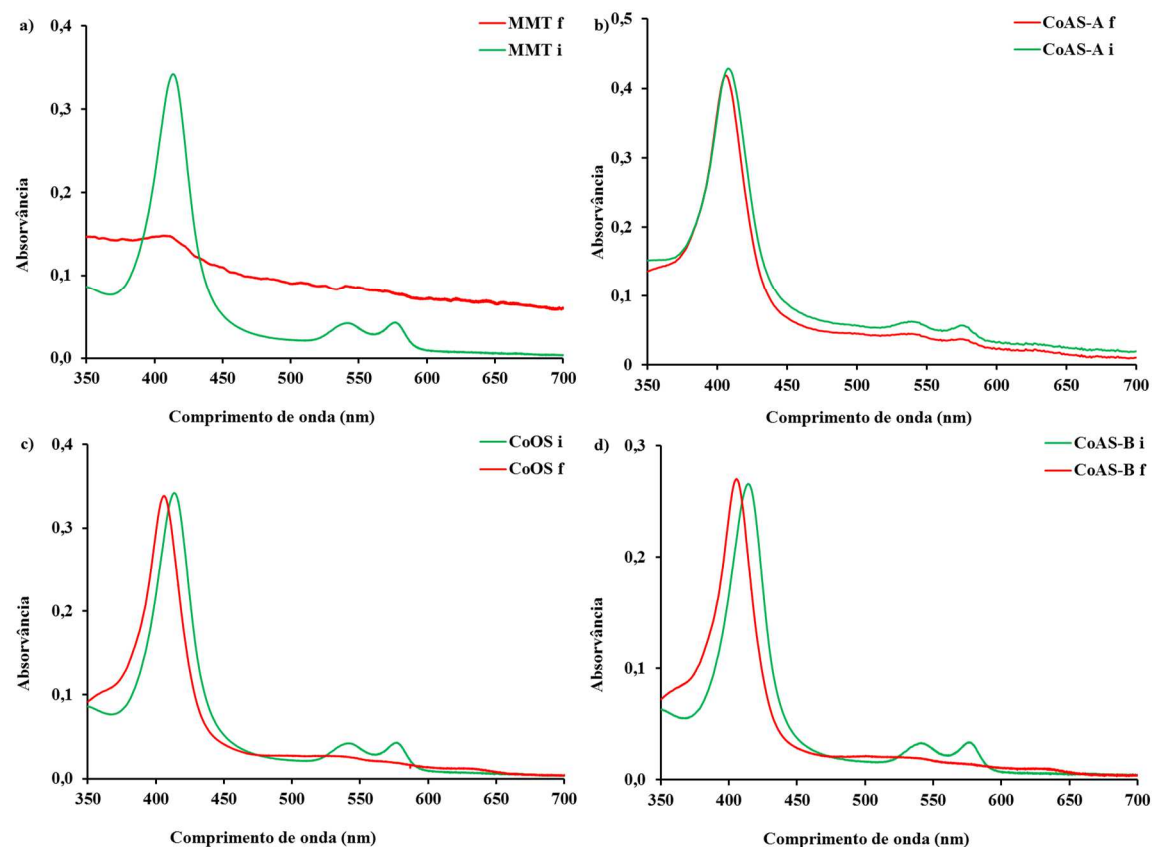


Figura V.IV. 12 – Espectros de UV-Vis da hemoglobina inicial e final: após 2h de ensaio de liberação de NO com a) MMT, b) CoAS-A e 3 h de ensaio de liberação de NO com c) CoOS, d) CoAS-B. Nas figuras o “i” corresponde a espectro inicial e o “f” e ao espectro final.

Os resultados na forma de concentração de NO *versus* tempo encontram-se apresentados na Figura V.IV. 13 e as quantidades máximas libertadas na Tabela V.IV. 1. Como foi determinado nos ensaios em fase gasosa as amostras CoAS-A e CoOS adsorveram um teor de NO muito próximo e libertaram, ao fim das 20 h quantidades também muito próximas. Já na fase líquida, a amostra CoOS libertou mais do dobro da CoAS-A. O material CoAS-A manteve sempre um perfil de liberação de NO linear ao longo do tempo de duração do ensaio. O material CoOS manteve também um perfil de liberação linear até às 2 h de ensaio, começando depois a ter uma cinética de liberação mais lenta, tendendo para um patamar.

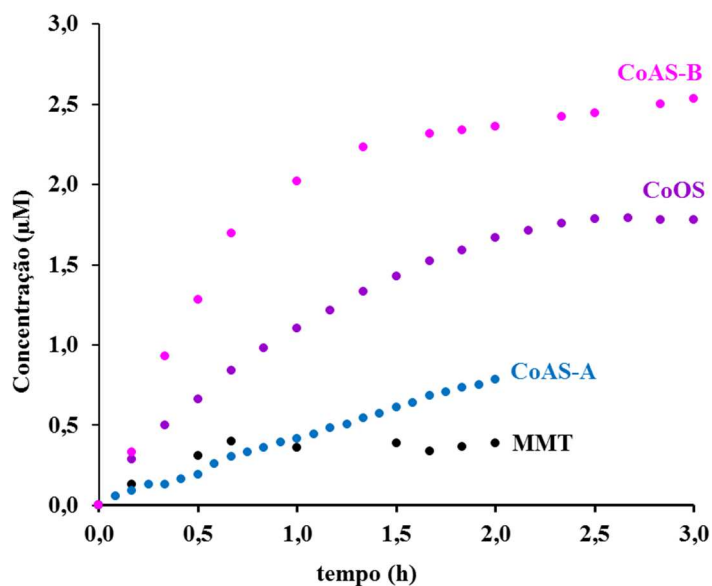


Figura V.IV. 13 - Liberação de NO em fase líquida em função do tempo.

O material CoAS-B, foi o que em fase líquida libertou um teor de NO mais elevado. A sua cinética de libertação durante a primeira hora de ensaio é mais rápida, e linear com o tempo, tornando-se depois mais lenta.

Tabela V.IV. 4 - Liberação de NO em fase líquida ao fim de 2 h.

Material	[NO] (µM)	[NO] (µM/g _{material})	mNO (µgNO/g _{material})
MMT	0,4	89	8
CoAS-A	0,8	174	16
CoOS	1,7	371	33
CoAS-B	2,4	525	47

Aos resultados da cinética de libertação de NO em fase líquida, foram aplicados os modelos cinéticos anteriormente descritos (Equação V.I.1 a Equação V.I.3). A fração de NO libertada ao tempo e os ajustes pelo respetivo modelo cinético encontram-se na Figura V.IV. 14.

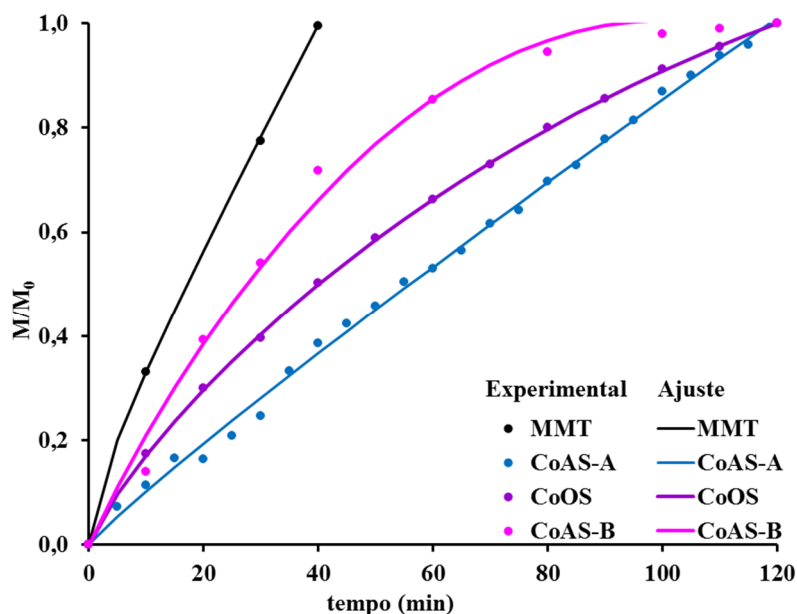


Figura V.IV. 14 – Fração libertada de NO (M/M_0) na fase líquida

O modelo de Peppas-Sahlin é o que melhor se ajusta a todos os materiais exceto CoAS-A, para o qual o modelo que melhor se ajusta é o de Korsmeyer-Peppas. A Montmorilonite apresentou uma cinética de libertação de NO muito rápida, tendo atingido o seu máximo de libertação durante a primeira hora de ensaio.

Da aplicação dos modelos cinéticos o que melhor se ajusta para os materiais MMT, CoOS e CoAS-B é o de Peppas-Sahlin, significando assim que libertam NO segundo dois mecanismos: difusão e/ou expansão. Nos materiais CoOS e CoAS-B a constante cinética de relaxação toma valores negativos, no entanto estes valores são muito próximos de zero pelo que podem ser considerados nulos. Tal facto não invalida que a cinética não seja puramente Fickiana. Para estes três casos o mecanismo predominante foi o de difusão ($k_d \gg k_r$) - Tabela V.IV. 5- embora a interação das argila com o meio de libertação possa de facto ter contribuído para a expansão das mesma ou ter de alguma forma influenciado a libertação de óxido nítrico. No caso da amostra CoAS-A, esta segue o modelo de Korsmeyer-Peppas, embora não se possa afirmar que a libertação de NO seja puramente Fickiana, visto que o coeficiente de difusão tenha sido superior a 0,5.

Tabela V.IV. 5 - Resultados da aplicação dos modelos cinéticos para a libertação de NO em fase líquida.

Material	Peppas-Sahlin		
	k_d	k_r	n
MMT	$0,063 \pm 0,004$	$0,005 \pm 0,003$	$0,605 \pm 0,126$
CoOS	$0,026 \pm 9,68 \times 10^{-4}$	$-1,42 \times 10^{-4} \pm 7,68 \times 10^{-6}$	$0,831 \pm 0,011$
CoAS-B	$0,025 \pm 0,006$	$-1,56 \times 10^{-4} \pm 7,70 \times 10^{-5}$	$0,951 \pm 0,061$
	Korsmeyer-Peppas		
	k	n	
CoAS-A	$0,012 \pm 7,92 \times 10^{-4}$	$0,922 \pm 0,144$	

k_d , constante cinética de difusão da equação de Peppas-Sahlin (min^{-n}); k_r , constante cinética de relaxação da equação de Peppas-Sahlin (min^{-2n}); k , constante cinética de difusão da equação de Korsmeyer (min^{-n}); n , expoente de libertação.

V.IV.3 – Conclusão

Preparam-se argilas sintéticas usando duas fontes distintas de sílica, ácido silícico (AS) e tetrametilortosilicato (TMOS). A caracterização textural das amostras confirmou a síntese das argilas. As argilas sintetizadas não só apresentaram uma área superficial substancialmente superior à da Montmorilonite (uma argila natural do grupo das esmectites) como possuem uma maior capacidade para adsorver óxido nítrico.^{12, 28}

Visto se terem obtidos resultados bastante promissores relativamente à adsorção e cinética de libertação de NO nas amostras sintetizadas, CoAS-A, CoOS e CoAS-B, estas amostras foram estudadas quanto à sua toxicidade em ensaios com células HeLa.

**V.V – Estudos de Adsorção e Libertação de NO -
Comparação de Materiais**

Entre as secções V.I e V.IV foram preparados diversos materiais, dos quais foram seleccionados os que apresentaram melhores características, quer texturais quer de melhor relação adsorção/libertação de NO. Nesta secção comparam-se os resultados da adsorção de NO em fase gasosa e respetiva libertação tanto em fase gasosa como em fase líquida, dos materiais seleccionados.

V.V.1. - Fase gasosa

Na Figura V.V. 1 estão resumidos os resultados para a adsorção e libertação de NO em todos os materiais seleccionados. Pode observar-se que em todos os materiais preparados (PILCs, “organoclays” ou argilas sintéticas) a capacidade de adsorção de NO é bastante superior quando comparada com a capacidade de adsorção das argilas naturais. De todos os materiais, o que apresentou uma capacidade de armazenamento de NO mais elevada foi o material AlS-P ($59 \text{ mg}_{\text{NO}} \text{ g}_{\text{sólido}}^{-1}$), seguido das argilas sintéticas, CoOS e CoAS-A ($50,9$ e $45,0 \text{ mg}_{\text{NO}} \text{ g}_{\text{sólido}}^{-1}$, respetivamente). A capacidade de adsorção de NO nas “organoclays” também foi consideravelmente elevada, tendo em conta que apenas se procedeu a uma intercalação e não formação à formação de pilares. A sua capacidade de adsorção de NO foi, por exemplo, superior à das amostras com pilares de óxido de titânio preparadas a partir da Montmorilonite e muito semelhante aos materiais com pilares mistos de óxidos de cobalto e titânio.

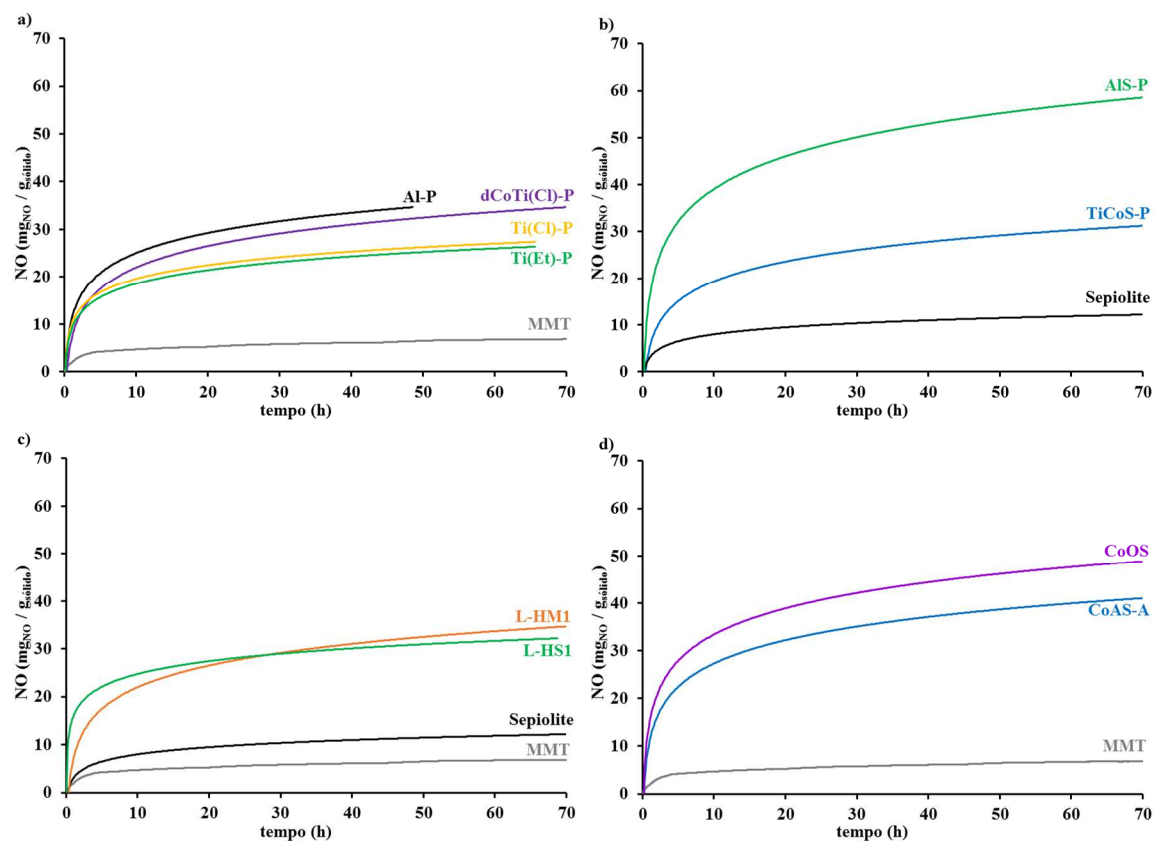


Figura V.V. 1 – Adsorção de NO em fase gasosa.

Relativamente à fração libertada, e no geral (Figura V.V. 2) houve sempre uma parte de NO adsorvido que não foi libertado. A Sepiolite foi o material que libertou a maior percentagem de NO, relativamente ao teor adsorvido, seguida pela amostra Ti(Et)-P.

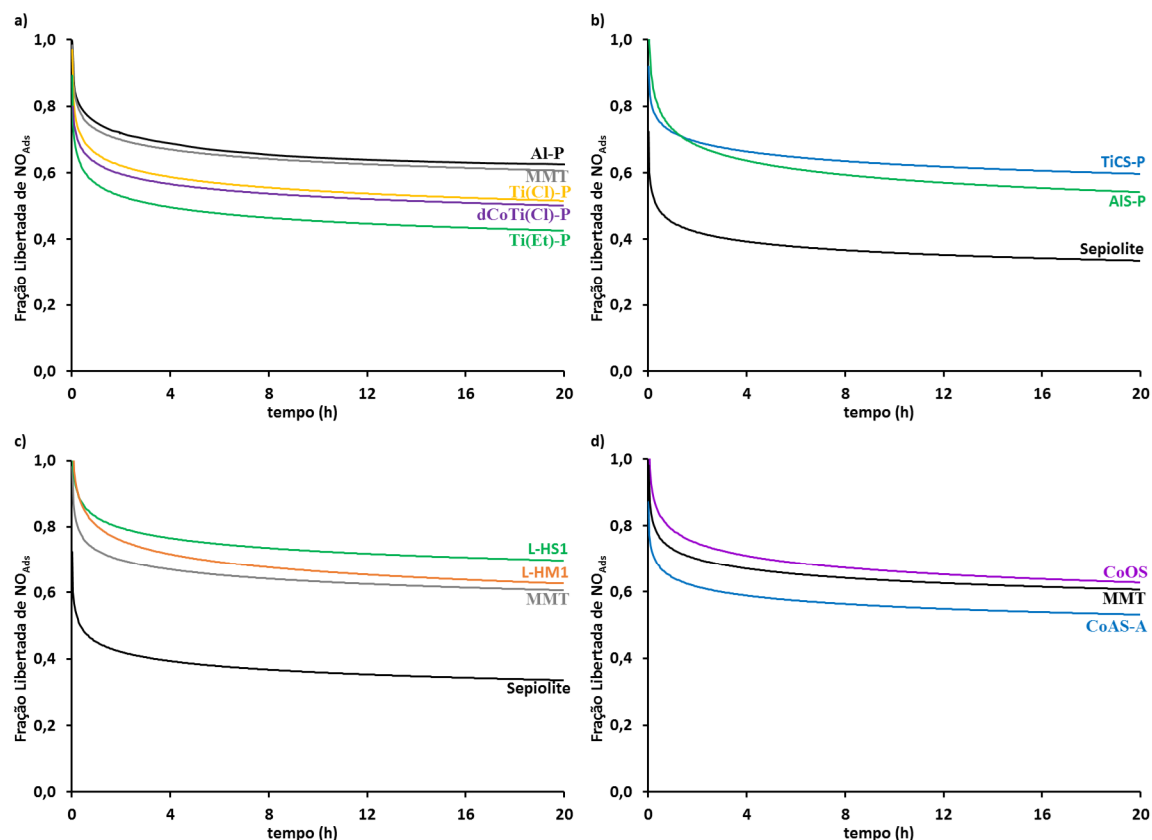


Figura V.V. 2 – Fração libertada de NO_{Ads}.

Como foi já discutido anteriormente, a relação entre adsorção/libertação não é direta, ou seja, nem sempre se verificou que o material que maior teor de NO adsorveu foi o que mais libertou. Tal facto deve-se às interações do material com a molécula de NO. Por exemplo, um dos materiais que maior teor de NO adsorveu (CoOS) foi o que menos libertou. No caso da amostra AIS-P verificou-se que, tendo sido o material que maior teor de NO adsorveu foi também o que mais libertou. De um modo geral, excetuando as amostras AIS-P, dCoTi(Cl)-P e Ti(Et)-P, as restantes libertaram aproximadamente o mesmo teor de NO, tendo sido as amostras L-HSM1 e CoOS as que menor quantidade NO libertaram.

A cinética de libertação de NO em fase gasosa seguiu o modelo de Korsmeyer-Peppas. As amostras que apresentaram constantes cinéticas mais elevadas foram as que possuem expoentes de libertação mais baixos. A Sepiolite foi, de todos os materiais, o que apresentou uma constante cinética mais elevada ($0,477 \text{ min}^{-n}$), seguido dos materiais CoAS-A e TiCoS-P ($0,449$ e $0,325 \text{ min}^{-n}$, respetivamente). Os materiais com cinéticas de libertação mais lenta foram, no geral, os derivados da Montmorilonite.

V.V.2 – Fase líquida

A libertação de NO em fase líquida está mais próxima da libertação em meio fisiológico. Os resultados da libertação de NO em fase líquida encontram-se na Figura V.V. 3. A Montmorilonite foi o material que libertou um menor teor de NO, e as PILCs derivadas da Montmorilonite foram, no geral, os materiais que menos NO libertaram em contacto com a solução de oxi-hemoglobina. No entanto, foi a amostra de Montmorilonite intercalada com L-histidina, L-HM1, a que libertou o teor de NO mais elevado ($50 \mu\text{gNO/g}_{\text{material}}$).

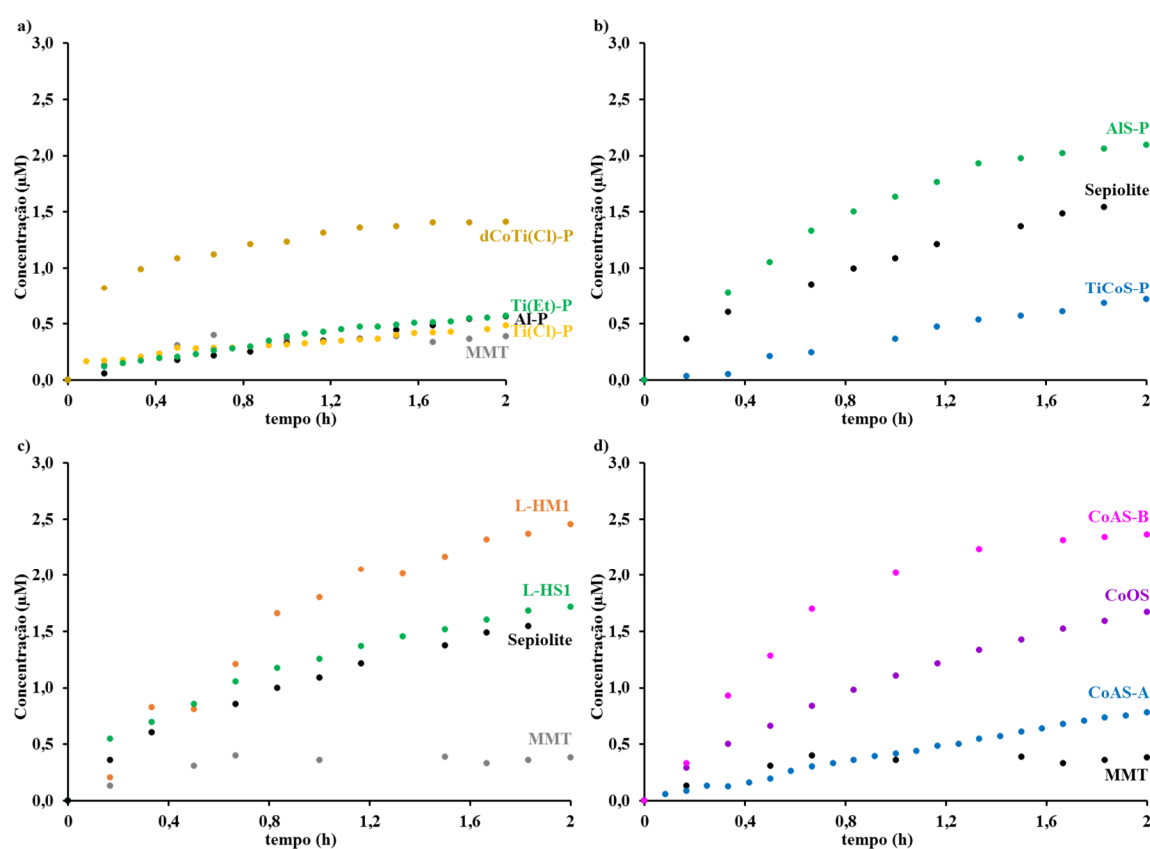


Figura V.V. 3 - Libertação de NO em fase líquida.

Dos materiais preparados a partir da Sepiolite, a amostra AIS-P foi a que libertou o maior teor de NO ($42 \mu\text{gNO/g}_{\text{material}}$). A própria Sepiolite natural libertou um teor de NO considerável ($30 \mu\text{gNO/g}_{\text{material}}$), quando comparando com vários outros materiais, em especial as PILCs preparadas a partir da Montmorilonite.

As argilas sintéticas apresentaram também resultados interessantes, sendo os materiais preparados a partir do ácido silícico, mas por vias diferentes, os que apresentam maior e menor teor de NO libertado, CoAS-B e CoAS-A respetivamente.

Em fase líquida, no geral, o perfil cinético de libertação de NO é bastante linear com o tempo, embora alguns materiais apresentem uma cinética de libertação um pouco mais rápida na fase inicial. De um modo geral, nas argilas não modificadas, Montmorilonite, CoAS-B e CoOS o perfil de libertação segue o modelo Peppas-Sahlin, indicando haver uma interação entre o material e o meio (provavelmente a expansão da argila) que influenciam a libertação de NO. Já nas argilas intercaladas com L-histidina, a cinética de libertação ocorre por difusão puramente Fickiana. Nos restantes materiais a libertação de NO ocorre também por difusão, embora esta não seja puramente Fickiana.

Os materiais referidos nesta secção foram os que apresentaram os melhores resultados, dentro do objetivo deste trabalho, na relação entre a adsorção e libertação de NO. Sendo os mais promissores, estes materiais foram estudados quanto à sua toxicidade em ensaios com células HeLa – secção V-VI.

V.VI – Ensaaios Toxicológicos

Como referido anteriormente, em contacto com as células vivas o Alamar Blue reduz-se passando de azul a rosa. Na Figura V.VI. 1 a) e b).encontra-se um exemplo para alguns materiais.

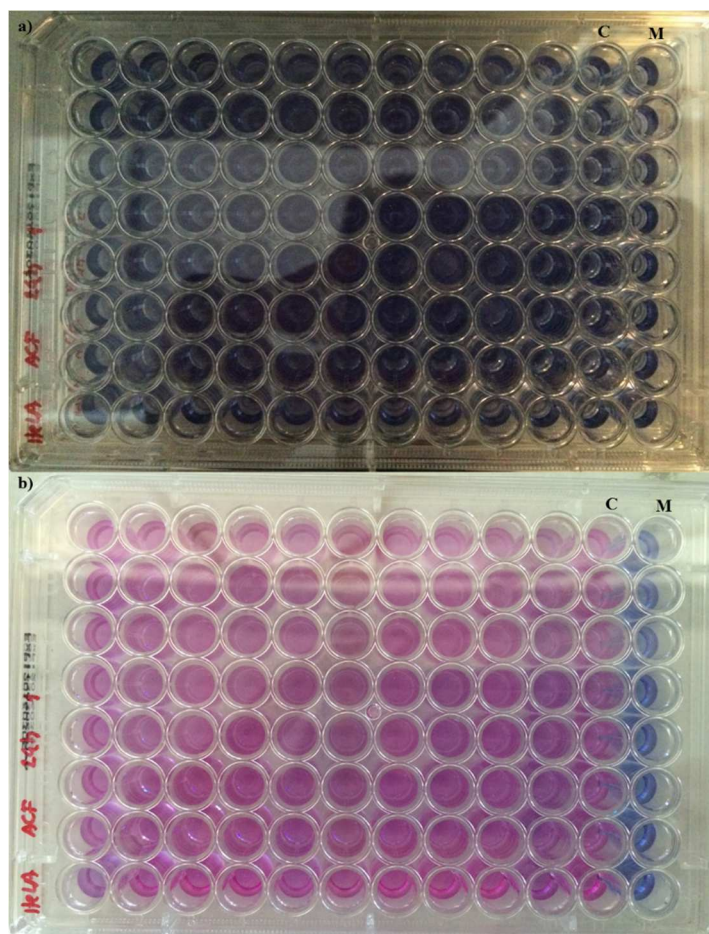


Figura V.VI. 1 - Microplacas plaqueadas para ensaios de fluorescência. a) Imediatamente após a adição de Alamar Blue, b) 4 h após adição de Alamar Blue. A coluna C corresponde a poços apenas com células sem amostras e M corresponde a poços apenas com meio, sem células.

Imediatamente após a adição de Alamar Blue todos os poços estão azuis, após 4 h de incubação, a coluna de meio que não tem células permanece azul (M), e a coluna que contém apenas células passou a rosa (C). Neste caso os restantes poços que contêm amostras de materiais preparados também passaram a rosa, uma indicação de que não apresentam elevada toxicidade (poderia ter existido uma variação de cor entre o azul e o rosa). Esta avaliação é no entanto meramente qualitativa, o Alamar Blue quando reduzido emite fluorescência e é a intensidade de fluorescência que permite quantificar a viabilidade celular.

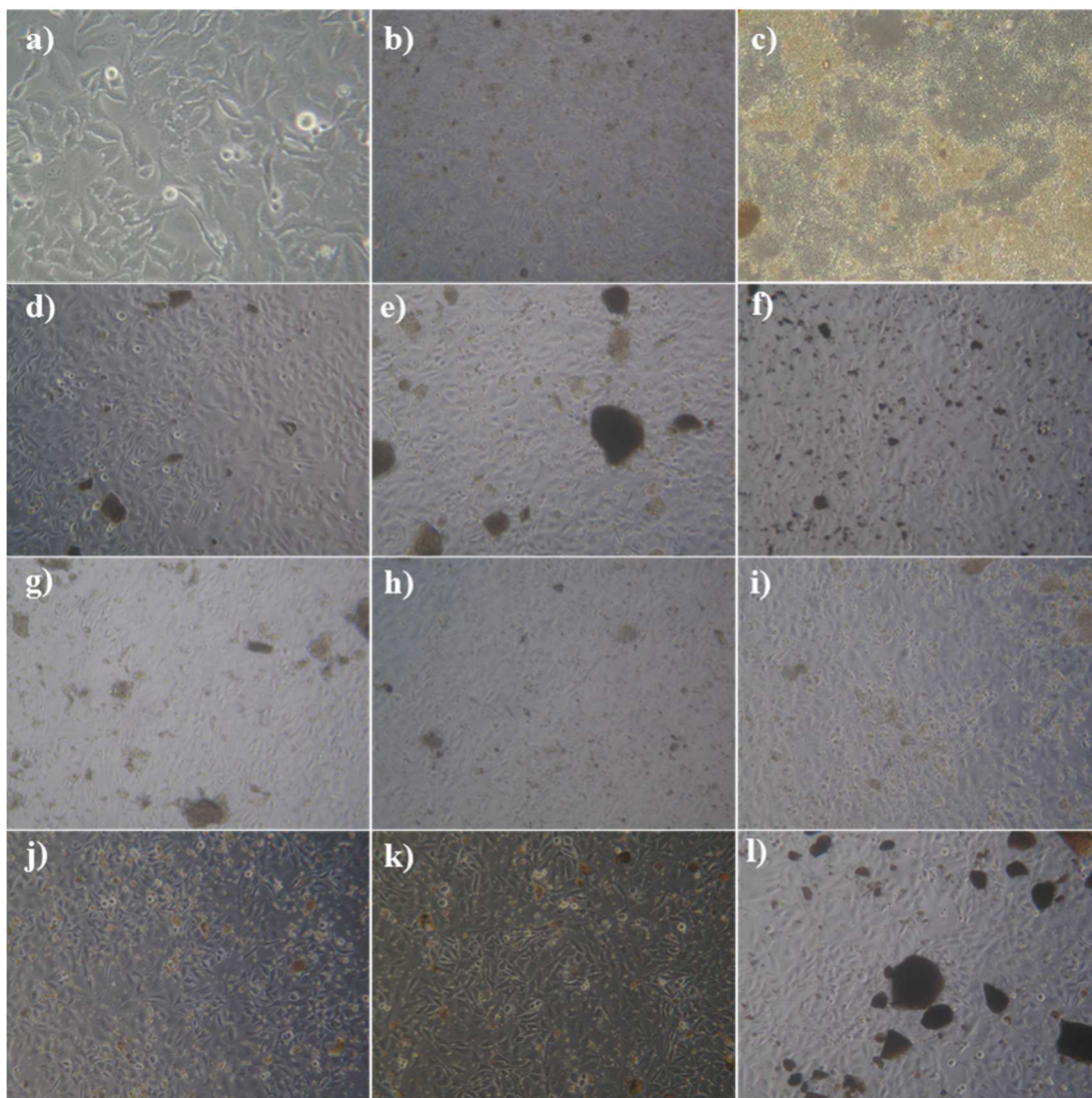


Figura V.VI. 2 –a) Células sem amostra; Células com: b) MMT, c) Sepiolite, d) Al-P, e) dCoTi(Cl)-P, f) AlS-P, g) TiCoS-P, h) L-HMI, i) L-HSI, j) CoAS-A, k) CoOS, l) CoAS-B.

Na Figura V.VI. 2 podem observar-se as células na presença dos materiais testados quanto à sua toxicidade. A visualização das células dependeu do material e do tamanho das partículas. Materiais com partículas de maiores dimensões tornaram um pouco mais fácil a observação das células.

V.VI.1 – Ensaios de fluorescência – Viabilidade em função do tempo de contacto

A viabilidade das células foi testada após 24 e 72 h de contacto com o material, tal como descrito na secção IV.4. Posteriormente foi adicionado Alamar Blue e 4 h depois foi

medida a fluorescência. Os resultados apresentados são já uma média de várias réplicas e leituras.

Consideraram-se as células sem amostra como sendo o controlo, nas quais a viabilidade é de 100 %, sendo que a viabilidade das células em contacto com os materiais teve sempre em conta o controlo e foi determinada como explicado anteriormente – secção IV.4. Optou-se por se estudar a toxicidade dos materiais a uma concentração bastante elevada, próxima do limite superior que é normalmente usado na literatura para avaliar a citotoxicidade de sílicas ou outros materiais porosos.¹¹⁰⁻¹¹³

Os resultados da citotoxicidade de materiais seleccionados, conforme mencionado anteriormente, são apresentados nesta secção por tipo de material.

Materiais a partir da Montmorilonite

Os resultados de toxicidade das amostras Al-P, Ti(Cl)-P, Ti(Et)-P e DCoTi(Cl)-P encontram-se na Figura V.VI. 3, a Montmorilonite foi também testada.

Como se pode observar na Figura V.VI. 3, após 24 h, a viabilidade das células é superior a 80 % na presença de qualquer um dos materiais. A partir da análise estatística pode considerar-se com 95 % de confiança que os valores médios de sobrevivência são semelhantes para todas as amostras testadas.

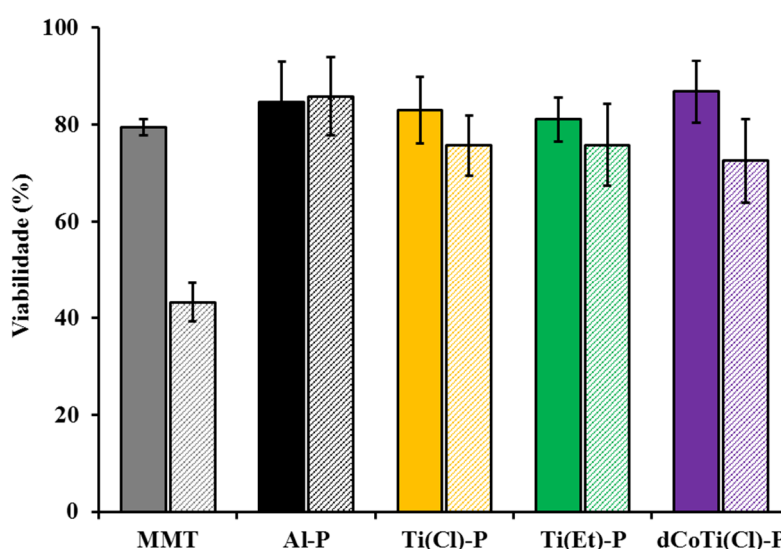


Figura V.VI. 3 – Viabilidade das células após contacto com a Montmorilonite e amostras preparadas a partir da Montmorilonite 24 e 72 h, com uma concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada coluna corresponde a uma média de valores ($n = 216$) \pm DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h.

Após 72 h de contacto com os materiais a viabilidade das células tendeu a diminuir, sendo então possível fazer algumas distinções entre os materiais. Na Montmorilonite, por exemplo, a viabilidade das células decresceu consideravelmente. Comparando com as restantes PILCs, a amostra dCoTi (Cl) -P parece ter sido o material que apresentou a maior queda na taxa de sobrevivência, embora o valor de sobrevivência se tenha mantido acima dos 70 %. As amostras com pilares de óxido de titânio, Ti(Cl)-P e Ti(Et)-P apresentam um comportamento muito semelhante entre si, quer após as 24 h ou as 72 h. No material Al-P a viabilidade é muito elevada, mesmo após as 72 h.

No geral, considerando os ensaios toxicológicos, a cinética de libertação de NO e o teor de libertação em fase líquida, das amostras estudadas neste grupo, a amostra Al-P foi a que apresentou os resultados mais favoráveis. Deste modo, foi avaliada a sua toxicidade a diferentes concentrações nas células, os resultados serão apresentados mais à frente nesta secção.

Materiais a partir da Sepiolite

Os resultados de toxicidade das amostras AIS-P e TiCoS-P encontram-se na Figura V.VI. 4, foi também testada a toxicidade da Sepiolite.

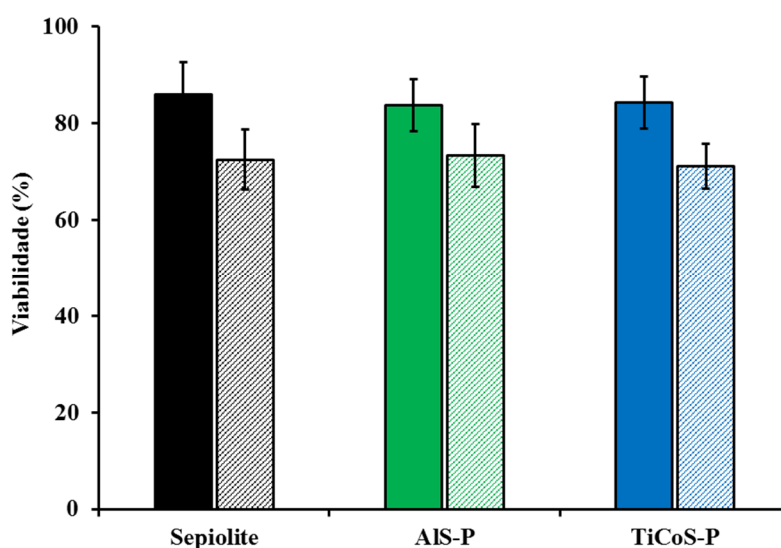


Figura V.VI. 4 – Viabilidade das células após contacto com a Sepiolite e amostras preparadas a partir da Sepiolite 24 e 72 h, com uma concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada coluna corresponde a uma média de valores ($n = 216$) \pm DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h.

Como se pode observar na Figura V.VI. 4, após 24 h, a viabilidade das células é superior a 80 % na presença de qualquer um dos materiais apresentando valores muito próximos. Após 72 h de contacto com os materiais a viabilidade das células diminuiu para cerca de 70 % em todas as amostras. A partir da análise estatística pode considerar-se com 95 % de confiança que os valores médios de sobrevivência são semelhantes para todas as amostras testadas.

Tendo em conta os resultados toxicológicos, teor de NO libertado em fase líquida e cinética de libertação aproximadamente linear com o tempo, a Sepiolite, sendo uma argila natural, foi o material que apresentou os resultados mais favoráveis. Este material foi assim selecionado para ensaios de variação da sua concentração em contacto com as células, cujos resultados serão apresentados mais à frente ainda nesta secção.

“Organoclays”

Foi testada a toxicidade das “organoclays”, menos concentradas em L-histidina, L.HM1 e L-HM2, apresentando-se os resultados na Figura V.VI. 5, a sua toxicidade foi comparada com a das argilas de partida.

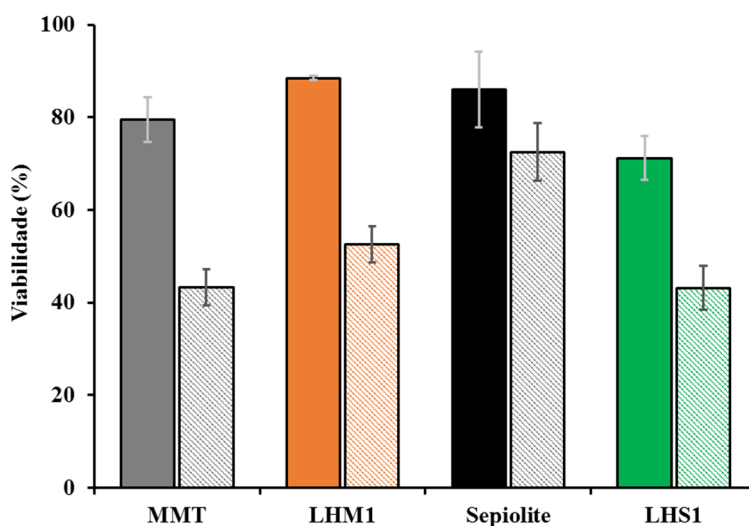


Figura V.VI. 5 – Viabilidade das células após contacto com as argilas naturais, Montmorilonite e Sepiolite, e amostras preparadas a partir destas argilas por intercalação com L-histidina (L-HM1 e L-HM2) 24 e 72 h, com uma concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada coluna corresponde a uma média de valores ($n = 216$) \pm DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h.

Como se pode observar na Figura V.VI. 5, as células em contacto com qualquer dos materiais, incluindo as argilas de partida, apresentam viabilidades superiores a 70 % após 24 h, tendo existido um decréscimo da viabilidade ao longo do tempo.

A Sepiolite mostrou apresentar menor toxicidade que a Montmorilonite, que após 72 h passou a apresentar considerável toxicidade para as células. Nas argilas intercaladas com L-histidina os resultados foram, no entanto, contrários. A amostra L-HM1 foi a menos tóxica após 24 h. Embora após 72 h de contacto das células com a amostra L-HM1 a sua viabilidade tenha decrescido para 50 %, os resultados foram melhores do que no caso de contacto com a L-HS1, onde a viabilidade das células desceu para valores abaixo dos 50 %.

Tendo em conta todos os resultados obtidos, incluindo a baixa toxicidade, resultados de adsorção e libertação de NO, foram efetuados ensaios de toxicidade com variação de concentração na amostra L-HM1.

Argilas sintéticas

No caso das argilas sintéticas (Figura V.VI. 6) pode observar-se que após 24 h de contacto com os materiais a viabilidade das células se manteve superior a 80 %, tendo-se mantido, inclusive, superior a 90 % quando em contacto com as amostras CoAS-A e CoOS. Observou-se um decréscimo na viabilidade após 72 h de contacto com os materiais, esse decréscimo foi mais acentuado nas amostras CoOS e CoAS-B, sendo que na CoOS a toxicidade foi superior a 50 %. Na amostra CoAS-A foi onde verificou uma menor diferença na viabilidade entre as 24 e 72 h.

Tendo em conta a baixa toxicidade da amostra CoAS-A, e a cinética de libertação em fase gasosa, que se apresenta de forma linear com o tempo, foram efetuados estudos de toxicidade com variação da concentração desta amostra.

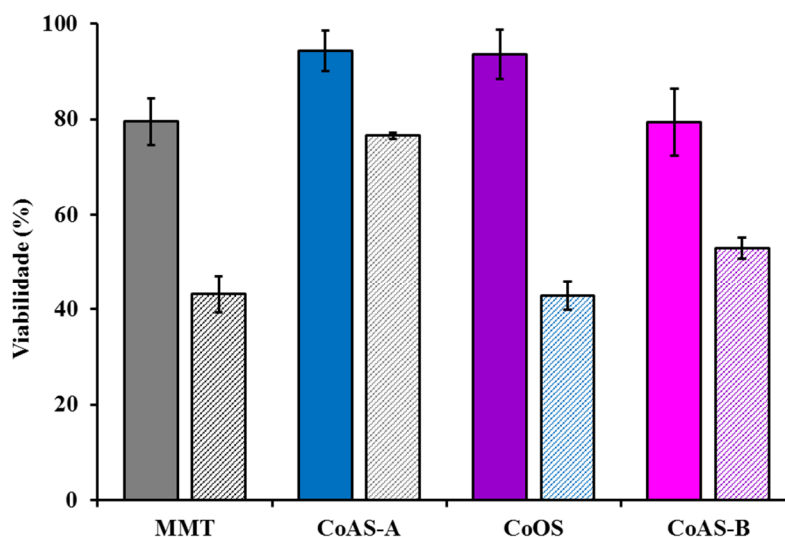


Figura V.VI. 6 – Viabilidade das células após contacto com a Montmorilonite e as argilas sintéticas. 24 e 72 h, com uma concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada coluna corresponde a uma média de valores ($n = 216$) \pm DP. Colunas a cheio-24 h, colunas a tracejado-72h.

V.VI.2 – Ensaios de fluorescência – Viabilidade em função da concentração

Tendo em conta os resultados dos ensaios toxicológicos obtidos após contacto com os materiais após 24 e 72 h, com uma concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$, escolheu-se, de cada uma das famílias de materiais, o material que apresentou melhores resultados para testar a sua toxicidade a diferentes concentrações, após um período de incubação de 24 h.

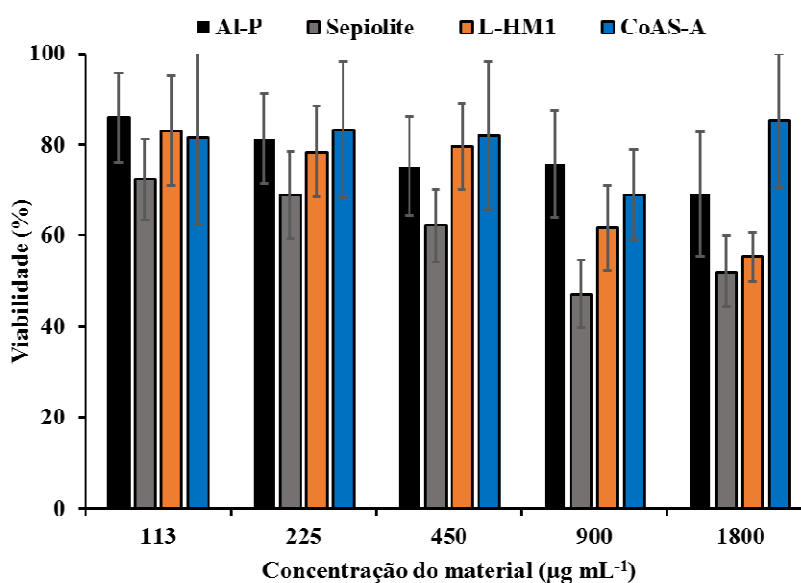


Figura V.VI. 7 - Viabilidade das células após contacto com os materiais a diferentes concentrações após um período de incubação de 24 h. Cada coluna representa uma média de valores ($n = 216$) \pm DP.

A Figura V.VI. 7 mostra os resultados após os ensaios de fluorescência, onde se fez variar a concentração dos materiais que estiveram em contacto com as células. Como pode ser visto a partir desta figura, a sobrevivência de células tende a diminuir com o aumento de concentração do material. No caso da amostra Al-P, a viabilidade das células permanece acima de 75 % até para a concentração de material tão elevada quanto $900 \mu\text{g mL}^{-1}$, caindo para perto de 70 % para $1800 \mu\text{g mL}^{-1}$. A Sepiolite por seu lado, para concentrações de 900 e $1800 \mu\text{g mL}^{-1}$ já apresenta toxicidade considerável, visto a viabilidade das células rondar os 50 %. O material L-HM1 apresenta alguma toxicidade até a partir dos $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ no entanto as células não deixam de ser viáveis. A amostra CoAS-A foi, de todas, a que apresentou menor toxicidade, mesmo para valores de concentração de $1800 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com efeito, para este material, excetuando para a concentração de $900 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde o valor médio da viabilidade das células decresceu para cerca de 70 %, para as restantes concentrações a viabilidade permaneceu acima dos 80 %.

Deve ser enfatizado que as taxas de sobrevivência apresentadas na Figura V.VI. 7, são elevadas quando comparadas com os descritos na literatura e, inclusive, a concentração de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ se encontra relatada na literatura como sendo das mais elevadas para materiais porosos, tais como sílicas, argilas ou MOFs.¹¹⁰⁻¹¹⁵

Viabilidade na presença de NO

Em alguns materiais foi testada a viabilidade das células com os materiais “carregados” com NO. O “loading” do NO foi efetuado nas amostras em pó seguindo o mesmo procedimento que na preparação para a libertação em fase líquida. Posteriormente, as amostras com NO foram adicionadas às células, com uma concentração de material de $450 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tal como pode ser observado na Figura V.VI. 8, a viabilidade das células na presença de material com NO não parece ter sofrido diferenças significativas, tendo sofrido apenas ligeiros aumentos para as amostras Al-P e AIS-P e um pequeno decréscimo para a amostra L-HM1.

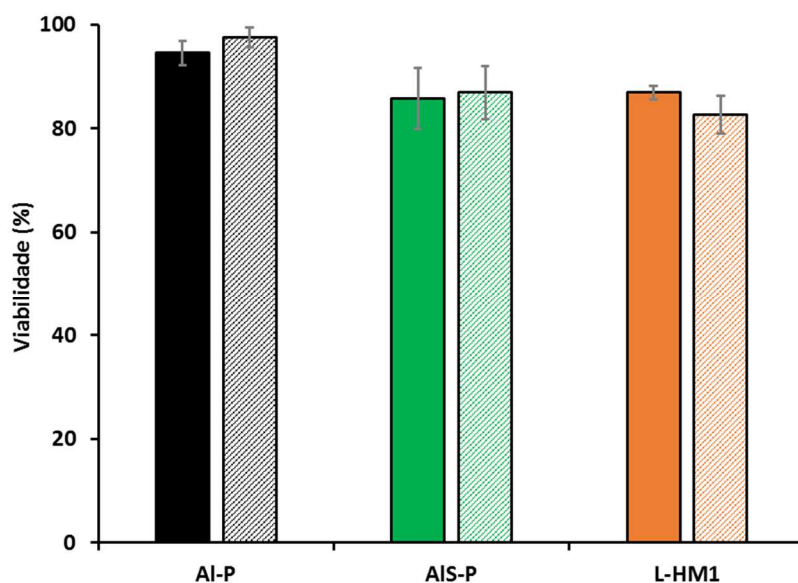


Figura V.VI. 8 – Viabilidade das células após 24 h incubação com os materiais (sem e com NO) As colunas são a média de valores ($n = 72$) \pm DP. Colunas a cheio materiais sem NO, colunas tracejadas materiais com NO.

V.VI.3 - Ensaio de “scratch”

Foi realizado um ensaio de “scratch” que, como referido anteriormente, pretende simular a cicatrização de uma ferida. Para este ensaio foram utilizadas as amostras Al-P, AIS-P e L-HM1. O ensaio foi realizado na presença e ausência de NO.

Na Figura V.VI. 9 estão apresentadas as fotografias capturadas imediatamente após o “scratch”, depois da adição das amostras, decorridas 8h e finalmente após 72 h. Como se pode observar pela figura, embora após 8 h não seja tão perceptível, após 72h o “scratch” ficou significativamente mais estreito.

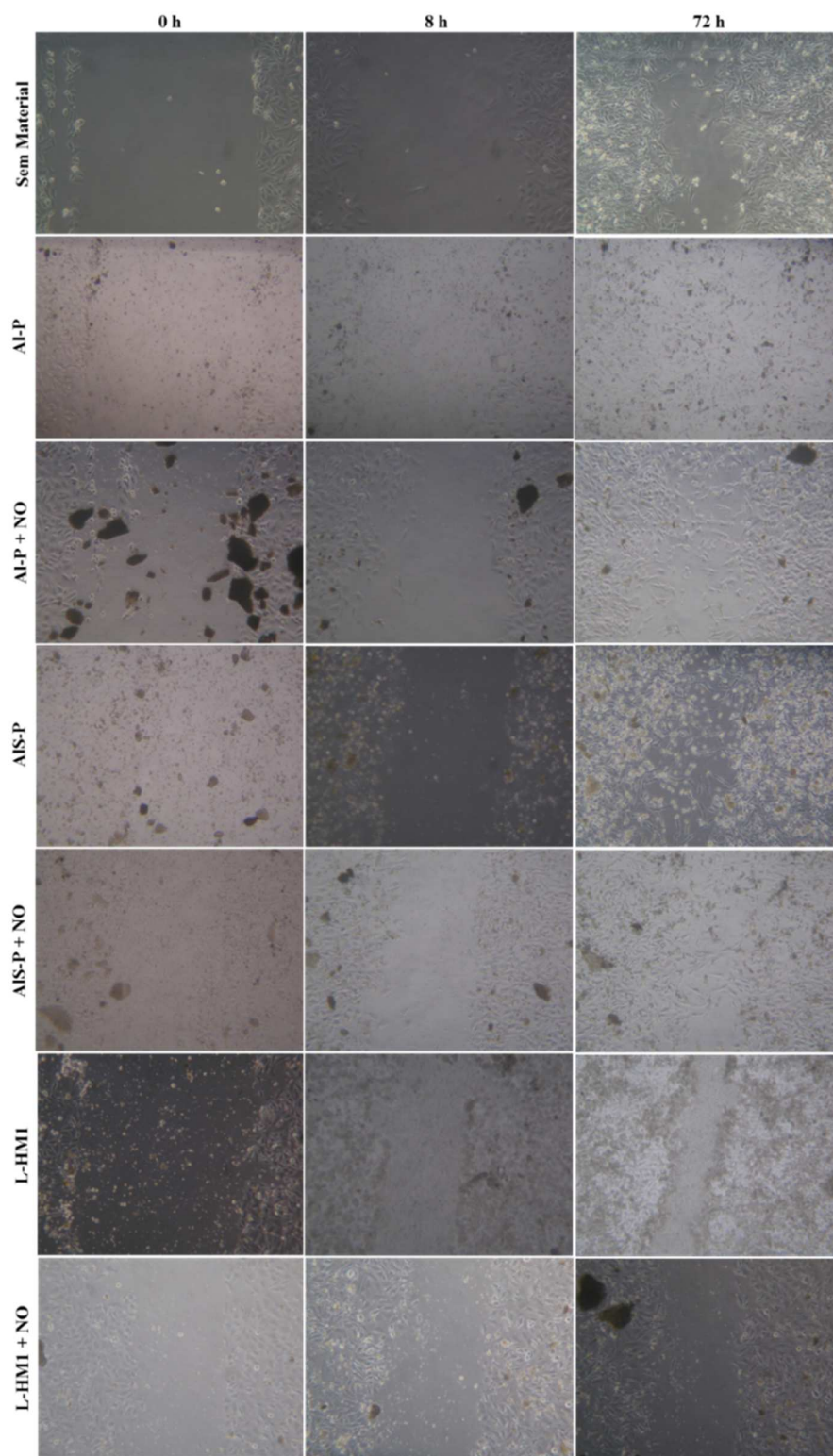


Figura V.VI. 9 – Fotografias do ensaio de scratch das células: sem material, em contacto com os materiais sem NO e em contacto com os materiais com NO. Fotos aos tempos inicial, 8 h e 72 h.

A distância do corte foi quantificada, apresentando-se os resultados na Figura V.VI.

10.

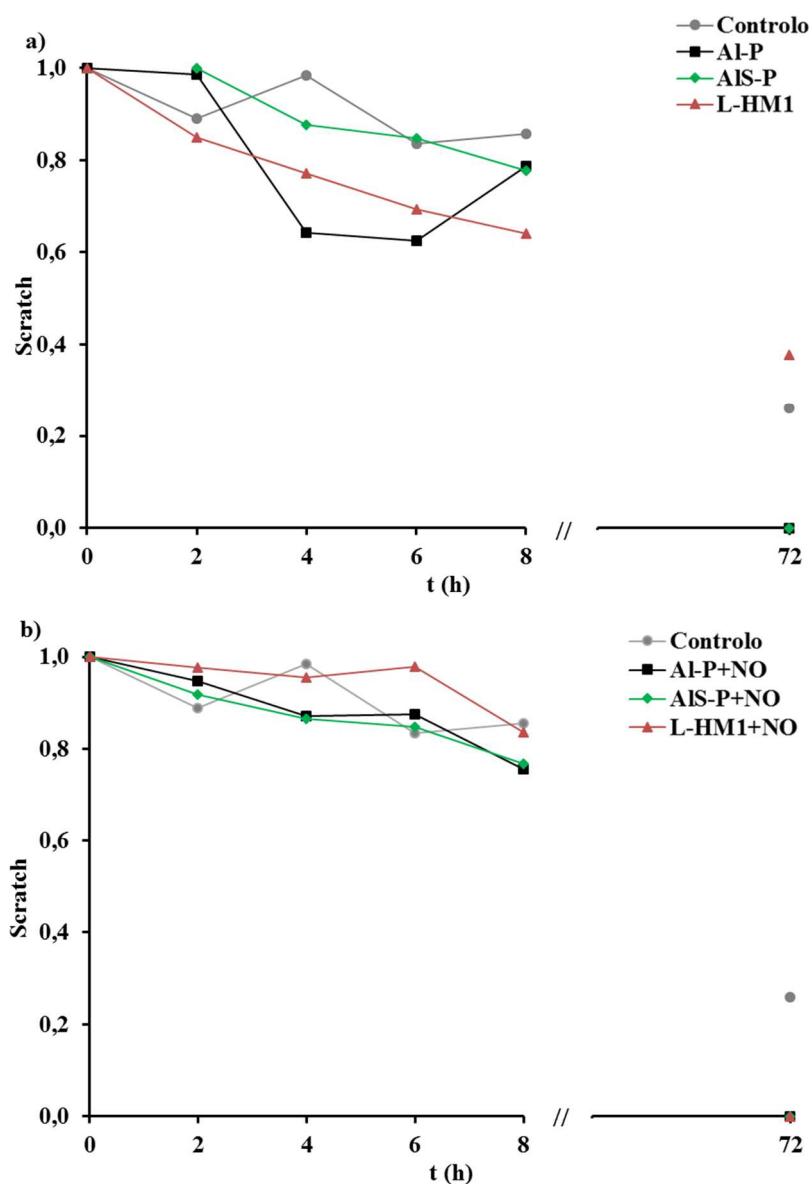


Figura V.VI. 10 – Diminuição do “scratch” ao longo do tempo: a) no controlo e na presença de alguns dos materiais preparados, mas sem NO, b) na presença de alguns dos materiais preparados, com NO adsorvido.

Os resultados da Figura V.VI. 10 apresentam-se normalizados, considerando-se o máximo como sendo a largura máxima inicial do “scratch”. Pode observar-se a partir desta figura a tendência para a diminuição do “scratch” ao longo do tempo. Na Figura V.VI. 10 a) pode observar-se que nas células que estiveram em contacto com a amostra L-HM1 apresentam uma diminuição da largura do corte linear, ao passo que com os restantes materiais os resultados foram muito díspares.

Na Figura V.VI. 10 b) apresentam-se os resultados para as células que estiveram em contacto com as amostras contendo NO. Neste caso, o comportamento das células foi muito semelhante independentemente das amostras com que as células estiveram em contacto,

embora ao fim das 8 h o “scratch” tenha fechado cerca de 10 % mais para as amostras Al-P e AIS-P.

Após 72 h o “scratch” fechou em quase todas as células excetuando nas células controlo (com uma diminuição de cerca de 80 %) e nas células incubadas com a amostra L-HM1 (com uma diminuição de cerca de 70 %). Pelos resultados obtidos não se pode afirmar que o NO tenha influenciado positivamente a cicatrização da ferida. As próprias condições em que foi realizado este ensaio não terão sido as mais adequadas tendo em conta a reatividade do NO com o O₂. No entanto, a presença de material parece ter influenciado positivamente a regeneração das células.

V.VI.3 – Conclusão

Os estudos toxicológicos realizados com células HeLa mostraram uma elevada taxa de sobrevivência quando em contacto com as amostras. Observou-se que a viabilidade das células tende a diminuir com o aumento do tempo de contacto. Em amostras seleccionadas observou-se existir uma tendência para o decréscimo da sobrevivência das células com o aumento da concentração dos materiais. No entanto é importante salientar, uma vez mais, que se trabalhou a uma concentração de 450 µg mL⁻¹ que já é considerada bastante elevada.

Os ensaios de viabilidade com as amostras contendo NO não foram esclarecedores quanto à influência do NO nas células assim como também não foi esclarecedor o ensaio de “scratch”. No entanto, e tendo em conta a natureza do NO, estes ensaios não terão decorrido nas condições mais apropriadas, dadas as reações paralelas com o oxigénio que levam ao consumo do NO, pelo que será necessário otimizar a técnica para o caso mais específico do NO.

Capítulo VI

Conclusão Geral

Foi preparado um conjunto de materiais à base de argilas, por formação de pilares de óxidos de vários tipos de oligocatiões, a partir de duas argilas naturais, a Montmorilonite e a Sepiolite. Obtiveram-se deste modo argilas com pilares de óxido de alumínio, titânio e pilares mistos de óxidos de alumínio/cobalto, titânio cobalto e titânio zinco. Os materiais foram caracterizados quanto à sua estrutura e porosidade. Os materiais obtidos a partir da Montmorilonite apresentaram-se essencialmente microporosos, sendo que nas amostras com pilares de óxido de titânio, também foi encontrada mesoporosidade. Por seu lado, as amostras a partir da Sepiolite são essencialmente mesoporosas, apresentando no entanto as amostras com pilares de óxido de alumínio alguma microporosidade.

Foi estudada a adsorção e libertação de óxido nítrico nos materiais preparados, tanto em fase gasosa como em fase líquida. Nas amostras obtidas a partir da Montmorilonite, o teor de NO adsorvido em fase gasosa, assim como a cinética de libertação, não foram totalmente em linha com as propriedades de texturais, tais como a área específica e o volume poroso, sugerindo que se podem ter desenvolvido interações específicas entre a molécula de NO e os materiais. No caso das amostras obtidas a partir da Sepiolite, no geral, tanto em fase gasosa como em fase líquida o teor de NO adsorvido e libertado esteve mais em linha com as propriedades texturais. A adsorção (armazenamento) de NO nos materiais estudados ocorre essencialmente por adsorção física. Os valores de NO libertados em fase líquida encontraram-se dentro dos limites biológicos e, para alguns materiais, obteve-se uma cinética de libertação lenta com, inclusive, uma relação quase direta entre a fração libertada de NO e o tempo.

Os materiais com pilares de óxido de alumínio (Al-P e AlS-P), juntamente com alguns materiais com pilares mistos de óxidos de titânio e cobalto (dCoTi(Cl)-P e TiCoS-P) apresentaram-se como sendo os materiais mais promissores, tendo em conta as suas propriedades texturais e a relação da capacidade de armazenamento / libertação de NO. A própria Sepiolite se apresenta como um material bastante promissor, tendo em conta que se trata de um material natural e que portanto não existem os custos inerentes à sua preparação.

Prepararam-se argilas modificadas com moléculas orgânicas, por intercalação com L-histidina, a partir das mesmas argilas naturais, tendo os resultados obtidos confirmado a incorporação de L-histidina na estrutura das argilas. Os teores mais elevados de L-histidina foram determinados nos materiais obtidos a partir da Montmorilonite, estes resultados podem ser justificados pelas diferenças estruturais das duas argilas, ou seja, na maior capacidade de expansão da Montmorilonite comparativamente com a Sepiolite. Observou-se uma melhoria quer nos teores de NO adsorvidos quer no perfil de libertação nas

“organoclays”, em relação às argilas de partida, em particular para as amostras com a menor quantidade de L-histidina incorporada. Esta melhoria encontra-se provavelmente relacionada com as interações específicas da molécula de NO com os grupos -NH da L-histidina

Obtiveram-se argilas sintéticas usando duas fontes de silício distintas. Tendo em conta caracterização estrutural e textural destes materiais pode concluir-se que se conseguiu sintetizar argilas do tipo esmectite. Estas argilas não só apresentaram uma área superficial muito superior à da Montmorilonite como possuem uma capacidade de adsorção de NO também superior. Adicionalmente, apresentam tamanhos de partículas inferiores às argilas naturais o que pode estender as potenciais aplicações no âmbito da libertação do NO. As argilas sintéticas parecem bastante promissoras para atuarem como sistemas de transporte e libertação de NO aumentando as opções de bio-disponibilidade desta molécula.

Os materiais selecionados para os ensaios toxicológicos possuem uma boa capacidade par armazenar e libertar de forma lenta a molécula de óxido nítrico, e não apresentam toxicidade biológica significativa, pelo que são potencialmente viáveis como sistemas de libertação de óxido nítrico.

Capítulo VI

Perspetivas Futuras

Com o término deste estudo, surgiram algumas questões relativas aos resultados obtidos, que poderão ser esclarecidas com a realização de trabalhos futuros.

Deste modo, na sequência da caracterização dos materiais prevê-se a utilização de uma técnica complementar, nomeadamente Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com NO adsorvido, com vista a uma caracterização mais detalhada da interação do NO com os diferentes materiais.

Tendo em conta os resultados obtidos com as argilas sintéticas não modificadas, seria interessante estudar a capacidade de adsorção e libertação de NO nas PILCs e /ou PCHs obtidas a partir destes materiais.

Para quantificar de forma direta a libertação de NO dos materiais pretende-se otimizar a técnica potenciométrica, com o eletrodo seletivo de NO, de modo a que seja possível conseguir seguir a libertação de NO ao longo do tempo. Esta otimização poderá passar por testar concentrações mais baixas de NO ou por garantir a ausência de oxigénio na câmara do eletrodo de modo a evitar a degradação de NO à medida que se vai libertando.

Seria particularmente interessante otimizar os ensaios de “scratch”, de modo a minimizar a presença de oxigénio. Esta otimização poderia passar pela utilização de uma câmara de incubação que permitisse o controlo da atmosfera.

Seria também interessante estudar as formas de eliminação dos sistemas de transporte de NO (materiais preparados) do organismo, este estudo teria de ser testado *in vivo*.

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas

- 1 D. Paolino, M. Fresta, P. Sinna, M. Ferrari, in *Book Drug Delivery Systems*, Second Edition ed., ed. by Editor, John Wiley & Sons, Inc., City, **2006**, Chap. Chapter.
- 2 Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1650-1662.
- 3 J. T. S. Jr., A. C. Richards, R. Scheidt, M. J. Cima, R. Langer, in *Controlled Drug Delivery*, ed. by Wiley-VCH, **2000**, Vol. 39, pp. 2396-2407.
- 4 B. S. John, in *Book Controlled Delivery Oral Dosage Forms in the New Millennium*, ed., ed. by Editor, Ballantyne Ross Ltd International Media, City, **2000**, Chap. Chapter.
- 5 S. Wang, *Microporous and Mesoporous Materials* **2009**, *117*, 1-9.
- 6 J. Yang, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 965-966.
- 7 F. Tang, L. Li, D. Chen, *Advanced Materials* **2012**, *24*, 1504-1534.
- 8 P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P. K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Férey, R. E. Morris, C. Serre, *Chemical Reviews* **2012**, *112*, 1232-1268.
- 9 T. N. K. Raju, *The Lancet* **2000**, *356*, 346.
- 10 A. Ghaffari, D. H. Neil, A. Ardakani, J. Road, A. Ghahary, C. C. Miller, *Nitric Oxide* **2005**, *12*, 129-140.
- 11 R. L. Barreto, C. R. D. Correia, M. N. Muscará, *Química Nova* **2005**, *28*, 1046-1054.
- 12 L. Ignarro, J. Napoli C Fau - Loscalzo, J. Loscalzo, *Circ Res* **2002**, *90*, 21-8.
- 13 F. A. Carvalho, C. Saldanha, J. M. Silva, *Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa* **2003**, *8*.
- 14 Z. Ma, B. Moulton, *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, *255*, 1623-1641.
- 15 E. Karpuzoglu, S. A. Ahmed, *Nitric Oxide* **2006**, *15*, 177-186.
- 16 S. Moncada, *Journal of the Royal Society of Medicine* **1999**, *92*, 164-169.
- 17 N. J. Finnerty, S. L. O'Riordan, E. Palsson, J. P. Lowry, *Journal of Neuroscience Methods* **2012**, *209*, 13-21.
- 18 F. A. Carvalho, J. Martins-Silva, C. Saldanha, *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *20*, 505-508.
- 19 R. Mesquita, B. Picarra, C. Saldanha, J. M. E. Silva, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **2002**, *27*, 137-147.
- 20 P. Sonveaux, B. F. Jordan, B. Gallez, O. Feron, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2009**, *45*, 1352-1369.
- 21 R. E. Morris, P. S. Wheatley, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 4966-4981.
- 22 P. S. Wheatley, A. R. Butler, M. S. Crane, S. Fox, B. Xiao, A. G. Rossi, I. L. Megson, R. E. Morris, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 502-509.
- 23 A. C. McKinlay, B. Xiao, D. S. Wragg, P. S. Wheatley, I. L. Megson, R. E. Morris, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 10440-10444.
- 24 K.-D. Kroncke, C. V. Suschek, *Journal of Investigative Dermatology* **2008**, *128*, 258-260.
- 25 R. E. Morris, N. J. Hinks, A. C. McKinlay, B. Xiao, P. S. Wheatley, *Microporous and Mesoporous Materials* **2009**.

- 26 M. L. Pinto, J. Rocha, J. R. B. Gomes, J. Pires, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 6396-6402.
- 27 M. L. Pinto, A. C. Fernandes, J. Rocha, A. Ferreira, F. Antunes, J. Pires, *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 224-230.
- 28 N. J. Hinks, A. C. McKinlay, B. Xiao, P. S. Wheatley, R. E. Morris, *Microporous and Mesoporous Materials* **2010**, *129*, 330-334.
- 29 S. Fox, T. S. Wilkinson, P. S. Wheatley, B. Xiao, R. E. Morris, A. Sutherland, A. J. Simpson, P. G. Barlow, A. R. Butler, I. L. Megson, A. G. Rossi, *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 1515-1521.
- 30 B. Barth, M. Mendt, A. Pöpl, M. Hartmann, *Microporous and Mesoporous Materials*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.02.020>.
- 31 A. Lowe, P. Chittajallu, Q. Gong, J. Li, K. J. Balkus Jr, *Microporous and Mesoporous Materials* **2013**, *181*, 17-22.
- 32 M. Guisnet, F. R. Ribeiro, *Zeólitos Um mundo ao serviço d catálise*. Editor, Fundação Calouste Gulbenkian, Coimbra, **2004**.
- 33 U. Mueller, M. Schubert, F. Teich, H. Puetter, K. Schierle-Arndt, J. Pastre, *Journal of Materials Chemistry* **2006**, *16*, 626-636.
- 34 J. L. C. Rowsell, O. M. Yaghi, *Microporous and Mesoporous Materials* **2004**, *73*, 3-14.
- 35 V. Anand, R. Kandarapu, S. Garg, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 905-914.
- 36 H. H. Murray, *Clay Minerals* **1999**, *34*, 39-49.
- 37 C. Viseras, P. Cerezo, R. Sanchez, I. Salcedo, C. Aguzzi, *Applied Clay Science* **2010**, *48*, 291-295.
- 38 D. Songurtekin, E. E. Yalcinkaya, D. Ag, M. Selec, D. O. Demirkol, S. Timur, *Applied Clay Science* **2013**, *86*, 64-69.
- 39 B. Wicklein, M. Darder, P. Aranda, E. Ruiz-Hitzky, *Langmuir* **2010**, *26*, 5217-5225.
- 40 M. S. Lakshmi, M. Sriranjani, H. B. Bakrudeen, A. S. Kannan, A. B. Mandal, B. S. R. Reddy, *Applied Clay Science* **2010**, *48*, 589-593.
- 41 E. Ruiz-Hitzky, P. Aranda, M. Dardera, G. Rytwo, *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20*, 9306-9321.
- 42 S. Tunç, O. Duman, A. Çetinkaya, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *377*, 123-129.
- 43 Y. Yu, S. Qi, J. Zhan, Z. Wu, X. Yang, D. Wu, *Materials Research Bulletin* **2011**, *46*, 1593-1599.
- 44 S. Akyüz, T. Akyüz, A. E. Yakar, *Journal of Molecular Structure* **2001**, *565-566*, 487-491.
- 45 S. Argast, *Clays and Clay Minerals* **1989**, *37*, 371-376.
- 46 M. Suárez, E. García-Romero, *Applied Clay Science* **2012**, *67-68*, 72-82.
- 47 A. Gil, L. Gandia, M. V. M., *CatalysisS Reviews - Scienceand Engineering* **2000**, *42*, 145.
- 48 M. B. Carvalho, J. Pires, A. P. Carvalho, *Microporous Materials* **1996**, *6*, 65-77.

-
- 49 P. R. Pereira, J. Pires, M. B. de Carvalho, *Langmuir* **1998**, *14*, 4584-4588.
- 50 S. Q. M. Leite, L. C. Dieguez, R. A. S. San Gil, S. M. C. Menezes, *Química Nova* **2000**, *23*, 149-154.
- 51 K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, *Pure & Applied Chemistry* **1985**, *57*, 603-619.
- 52 G. Fetter, P. Bosch, in *Pillared Clays and Related Catalysts*, ed. by A. Gil, S. A. Korili, R. Trujillano, M. A. Vicente, Springer New York, **2010**.
- 53 G. K. Zhang, X. M. Ding, F. S. He, X. Y. Yu, J. Zhou, Y. J. Hu, J. W. Xie, *Langmuir* **2008**, *24*, 1026-1030.
- 54 K. Bahranowski, J. Janas, T. Machej, E. M. Serwicka, L. A. Vartikian, *Clay Minerals* **1997**, *32*, 665-672.
- 55 S. Mallakpour, M. Dinari, *Applied Clay Science* **2011**, *51*, 353-359.
- 56 L. B. Paiva, A. R. Morales, F. R. Valenzuela Díaz, *Applied Clay Science* **2008**, *42*, 8-24.
- 57 L. Zampori, P. G. Stampino, C. Cristiani, G. Dotelli, P. Cazzola, *Applied Clay Science* **2010**, *48*, 97-102.
- 58 F. Shi, S. Liu, X. Su, *Talanta* **2014**, *125*, 221-226.
- 59 R. M. S. F. X. W. D. J. Kiemle, in *Book Spectrometric identification of organic compounds*, 7th ed., ed. by Editor, New York, Wiley, City, **1967**, Chap. Chapter, pp. 256.
- 60 J. Pires, M. B. Carvalho, A. P. Carvalho, *Zeolites* **1997**, *19*, 107-113.
- 61 L. S. Cheng, R. T. Yang, N. Chen, *Journal of Catalysis* **1996**, *164*, 70-81.
- 62 A. Gil, H. L. Del Castillo, J. Masson, J. Court, P. Grange, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1996**, *107*, 185-190.
- 63 A. Gil, A. Massinon, P. Grange, *Microporous Materials* **1995**, *4*, 369-378.
- 64 F. Belkhadem, A. Maldonado, B. Siebenhaar, J. M. Clacens, M. J. Perez Zurita, A. Bengueddach, F. Figueras, *Applied Clay Science* **2008**, *39*, 28-37.
- 65 J. L. Valverde, P. Sánchez, F. Dorado, C. B. Molina, A. Romero, *Microporous and Mesoporous Materials* **2002**, *54*, 155-165.
- 66 L. C. A. Oliveira, R. M. Lago, J. D. Fabris, C. Solar, K. Sapag, *Braz. J. Chem. Eng.* **2003**, *20*
- 67 E. González, A. Moronta, *Applied Catalysis A: General* **2004**, *258*, 99-105.
- 68 K. H. Stern, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1972**, *1*, 747-772.
- 69 A. V. Ghule, K. Ghule, C.-Y. Chen, W.-Y. Chen, S.-H. Tzing, H. Chang, Y.-C. Ling, *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 1202-1208.
- 70 T. Wanjun, C. Donghua, *Chemical Papers* **2007**, *61*, 329-332.
- 71 M. Chien, I. Pearson, K. Nobe, *Product R&D* **1975**, *14*, 131-134.
- 72 G. V. Yan Xiang, *Clays and Clay Minerals* **1996**, *44*, 515-521.
- 73 Y. F. Tadashi Mizutani, Akane Okada, Osami Kamigaito, Takayuki Yashi, *Clays and Clay Minerals* **1991**, *39*, 381-386.
- 74 B. Scott, J. Crouse, M. Correia, L. Sun, G. Villemure, *Applied Clay Science* **2010**, *48*, 46-54.

- 75 B. A. Sakharov, B. Lanson, in *HandBook of Clay Science Part B: Techniques and Applications*, second ed., ed. by F. B. a. G. Lagaly, Elsevier, Ltd, Netherlands, **2013**, Vol. 5.
- 76 T. Al-Ani, O. Sarapää, in *Book Clay and Clay Mineralogy*, ed., ed. by Editor, City, **2008**, Chap. Chapter, pp. 94.
- 77 B. D. Cullity, *Elements of X Ray Diffraction*. Editor, Addison-Wesley Publishing Inc., USA, **1956**.
- 78 S. Petit, J. Madejova, in *Handbook of Clay Science*, 2^a ed., Elsevier Ltd., UK, **2013**, Vol. 5B, Chap. 2.7, pp. 813.
- 79 G. Gauglitz, T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*. Editor, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGbA, **2003**, pp. 538.
- 80 C. Xu, X. Cai, J. Zhang, L. Liu, *Particuology*.
- 81 J. R. Françoise Rouquerol, Kenneth Sing, *Adsorption by Powders Porous Solids*. Editor, Academic Press, London, **1999**.
- 82 L. J. Michot, F. Villiéras, in *Developments in Clay Science*, ed. by B. Faïza, L. Gerhard, Elsevier, **2013**, Vol. Volume 5, pp. 319-332.
- 83 F. Bergaya, G. Lagaly, *Handbook of Clay Science*. second ed., Editor, Elsevier, **2013**, Vol. 5B.
- 84 J. Landers, G. Y. Gor, A. V. Neimark, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, 437, 3-32.
- 85 T. Kogure, in *HandBook of Clay Science PartB: Techniques and Applications*, second ed., ed. by F. B. a. G. Lagaly, Elsevier, Netherlands, **2013**, Vol. 5.
- 86 D. K. Martin Feelisch, Jürgen Werringloer, in *Methods in Nitric Oxide Research*, First ed., ed. by M. F. a. J. S. Stamler, John Wiley & Sons Ltd, **1996**, Chap. 31, pp. 732.
- 87 S. Al-Nasiry, N. Geusens, M. Hanssens, C. Luyten, R. Pijnenborg, *Human Reproduction* **2007**, 22, 1304-1309.
- 88 C.-C. Liang, A. Y. Park, J.-L. Guan, *Nature Protocols* **2007**, 2, 329-333.
- 89 Y. C. Boo, S. L. Tressel, H. Jo, *Nitric Oxide* **2007**, 16, 306-312.
- 90 B. Velde, *Introduction to Clay Minerals*. First ed., Editor, Chapman & Hall, London **1992**, pp. 198.
- 91 ICDD-JCPDS, *file n° 13-259*.
- 92 R. W. Fitzpatrick, J. Roux, U. Schwertmann, *Clays and Clay Minerals* **1978**, 26, 189-201.
- 93 A. Viani, A. F. Gualtieri, G. Artioli, *American Mineralogist* **2002**, 87, 966-975.
- 94 J. Siepman, F. Siepman, *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, 351-362.
- 95 C. Ferrero, D. Massuelle, E. Doelker, *Journal of Controlled Release* **2010**, 141, 223-233.
- 96 C. Ferrero, I. Bravo, M. R. Jiménez-Castellanos, *Journal of Controlled Release* **2003**, 92, 69-82.
- 97 X. Y. Wu, Y. Zhou, *Journal of Controlled Release* **1998**, 51, 57-71.
- 98 M. H. Shoaib, J. Tazeen, H. A. Merchant, R. I. Yousuf, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 19, 6.

-
- 99 Y.-S. Lin, Doctor of philosophy. Graduate School of the University Minnesot, **2012**.
- 100 N. A. Peppas, J. J. Sahlin, *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, 57, 4.
- 101 C. M. Lopes, J. M. S. Lobo, P. Costa, *2005* **2005**, 41, 12.
- 102 H. J. Motulsky, A. Christopoulos, *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A practical guide to curve fitting.*, Editor, GraphPad Software, Inc, San Diego CA, **2003**.
- 103 J. Pires, M. L. Pinto, J. M. Guil, *Adsorption* **2011**, 17, 287-292.
- 104 M. M. Dubinin, H. F. Stoeckli, *Journal of Colloid and Interface Science* **1980**, 75, 34-42.
- 105 R. Ruiz, J. C. del Moral, C. Pesquera, I. Benito, F. González, *Thermochimica Acta* **1996**, 279, 103-110.
- 106 L. Zhou, Z. Jing, Y. Zhang, K. Wu, E. H. Ishida, *Applied Clay Science* **2012**, 69, 30-36.
- 107 J.-e. Zhou, Y. Dong, S. Hampshire, G. Meng, *Applied Clay Science* **2011**, 52, 328-332.
- 108 J. E. Post, D. L. Bish, P. J. Heaney, *American Mineralogist* **2007**, 92, 91-97.
- 109 A. P. F. Albers, F. G. Melchiades, R. Machado, J. B. Baldo, A. O. Boschi, *Cerâmica* **2002**, 48, 34-37.
- 110 A. Bogershausen, S. J. Pas, A. J. Hill, H. Koller, *Chemistry of Materials* **2006**, 18, 664-672.
- 111 F. Y. Qu, G. S. Zhu, S. Y. Huang, S. G. Li, J. Y. Sun, D. L. Zhang, S. L. Qiu, *Microporous and Mesoporous Materials* **2006**, 92, 1-9.
- 112 S. W. Song, K. Hidajat, S. Kawi, *Langmuir* **2005**, 21, 9568-9575.
- 113 N. Venkatesan, J. Yoshimitsu, Y. Ito, N. Shibata, K. Takada, *Biomaterials* **2005**, 26, 7154-7163.
- 114 M. F. Calmon, A. T. de Souza, N. M. Candido, M. I. B. Raposo, S. Taboga, P. Rahal, J. G. Nery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 100, 177-184.
- 115 B. D. Kevadiya, R. P. Thumbar, M. M. Rajput, S. Rajkumar, H. Brambhatt, G. V. Joshi, G. P. Dangi, H. M. Mody, P. K. Gadhia, H. C. Bajaj, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, 47, 265-272.

Anexos

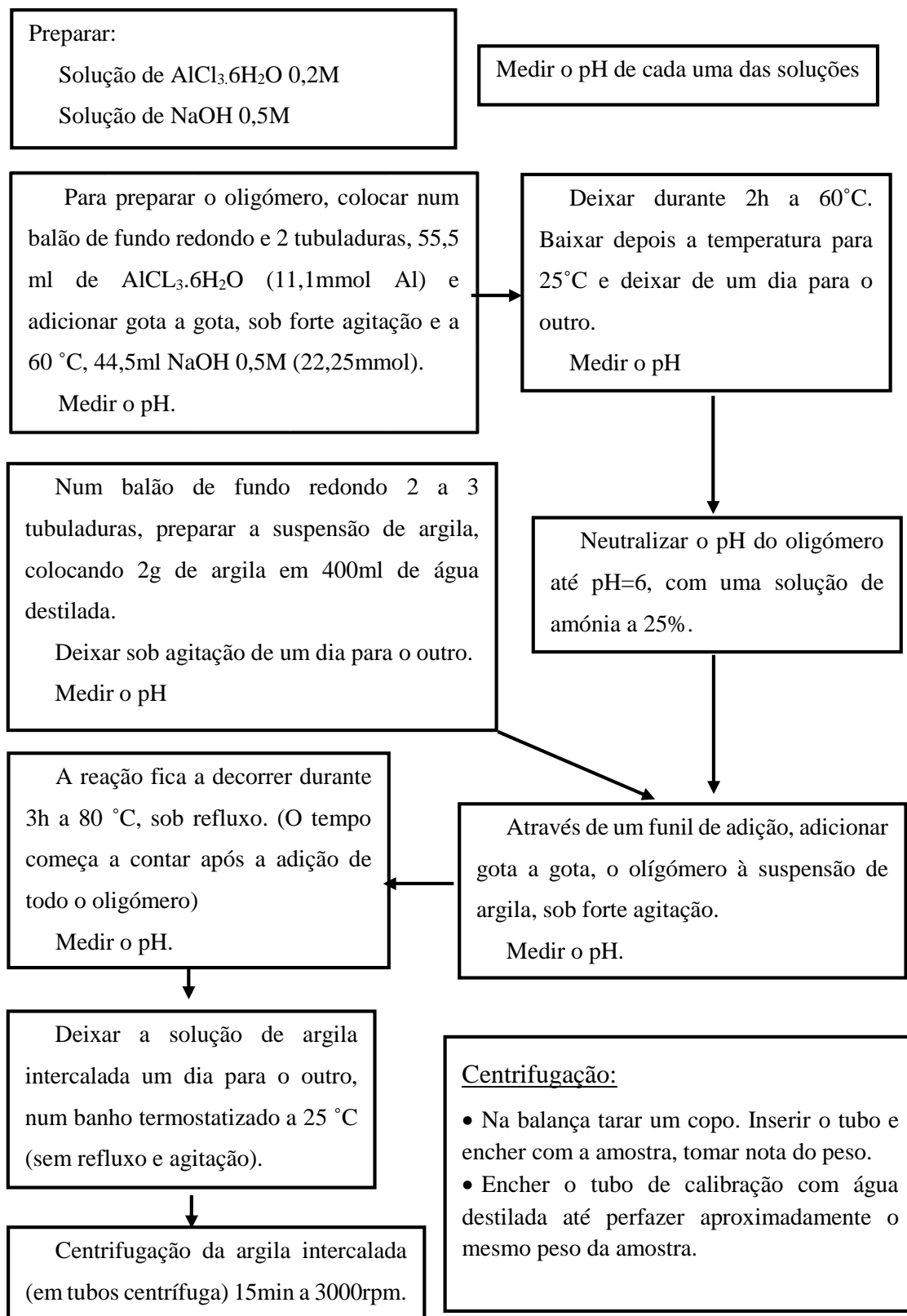
Índice de Anexos

Figura A.I. 1 - Intercalação com íons alumínio	v
Figura A.I. 2 - Intercalação com Cloreto de Titânio	vii
Figura A.II. 1 – a) Diferença de corrente com a adição de cada alíquota, b) Curva de calibração.....	xi
Figura A.II. 2 - Ensaio de libertação de NO. a) repetições da adição de 20 µL de solução nitrito, b) repetições da adição de 40 µL de solução nitrito.	xiii
Figura A.II. 3 - Libertação de NO da amostra L-HM1.....	xiv
Figura A.II. 4- Concentração de NO libertada da amostra L-HM1 (18 mg).....	xv
Figura A.III. 1 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a montorilonite.....	xix
Figura A.III. 2 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoAl-P.	xix
Figura A.III. 3 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Al-P.....	xix
Figura A.III. 4 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Ti(Et)-P.	xx
Figura A.III. 5 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Ti(Cl)-P,.....	xx
Figura A.III. 6 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a wCoTiCl-P,.....	xxi
Figura A.III. 7 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a dCoTiCl-P,.....	xxi
Figura A.III. 8 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Sepiolite.	xxii
Figura A.III. 9 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a ALS P.	xxii
Figura A.III. 10 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a ZnS.....	xxiii
Figura A.III. 11 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoS.....	xxiii
Figura A.III. 12 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a TiZnS-P.....	xxiv
Figura A.III. 13 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a TiCoS-P.....	xxiv
Figura A.III. 14 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoAS-A.....	xxv
Figura A.III. 15 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoOS.....	xxv
Figura A.III. 16- Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoS-B.....	xxvi
Figura A.IV. 1 - Espectro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de libertação de NO da amostra MMT.	xxix

Figura A.IV. 2 - Espetro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra Ti(Et)-P.	xxix
Figura A.IV. 3 - Espetro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra wCoTi(Cl)-P.....	xxx
Figura A.IV. 4 - Espetro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra ZnS.	xxx
Figura A.IV. 5 - Espetro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra CoS.....	xxxi
Figura A.IV. 6- Espetro de infravermelho da L-histidina.	xxxi
Figura A.IV. 7 - Espetro de infravermelho da Montmorilonite e das amostras L-HM1 e L-HM2.....	xxxii
Figura A.IV. 8 - Espetro de infravermelho da Sepiolite e das amostras L-HS1 e L-HS2.	xxxii

Anexo I - Parte Experimental

Figura A.I. 1 - Intercalação com íons alumínio



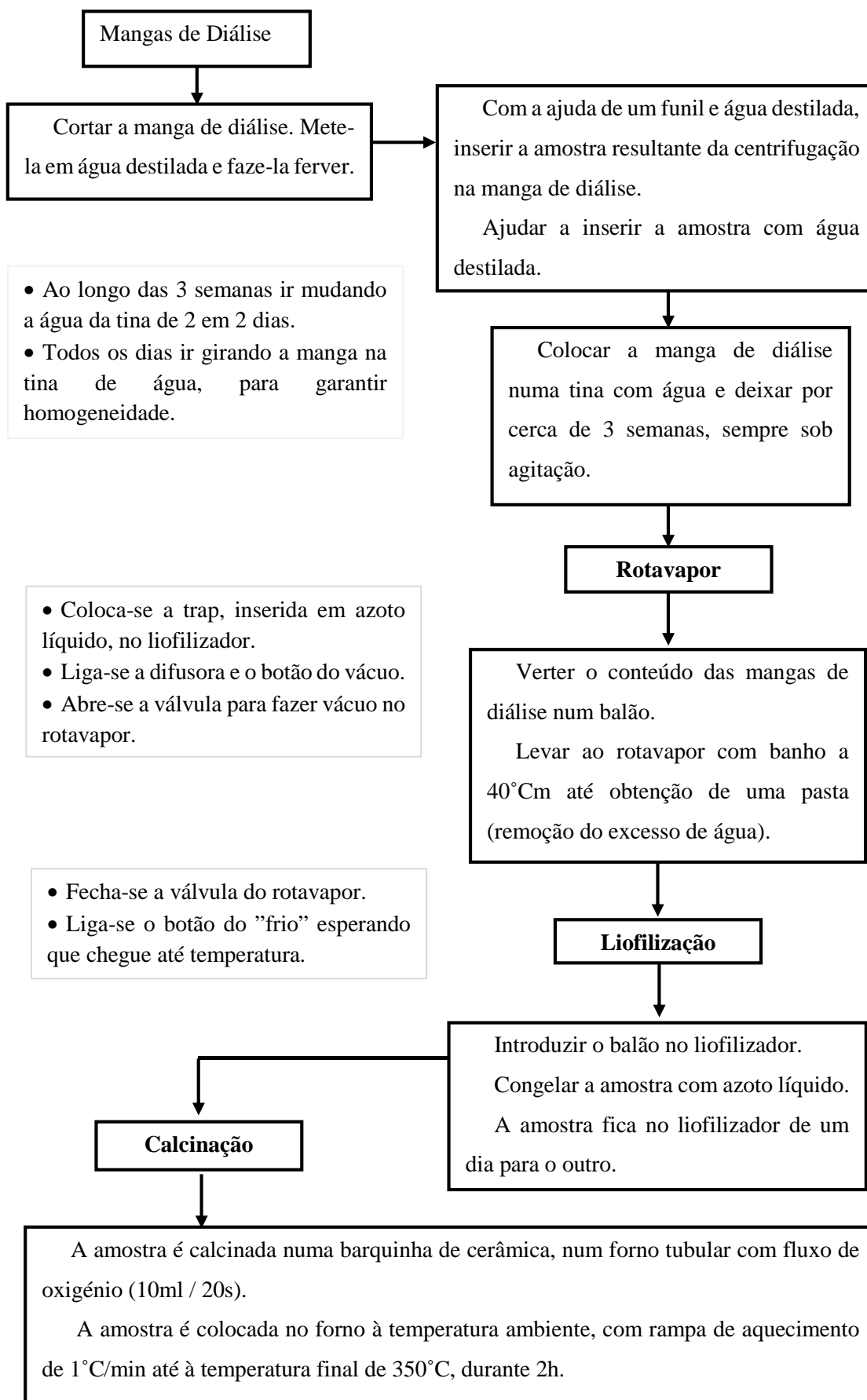
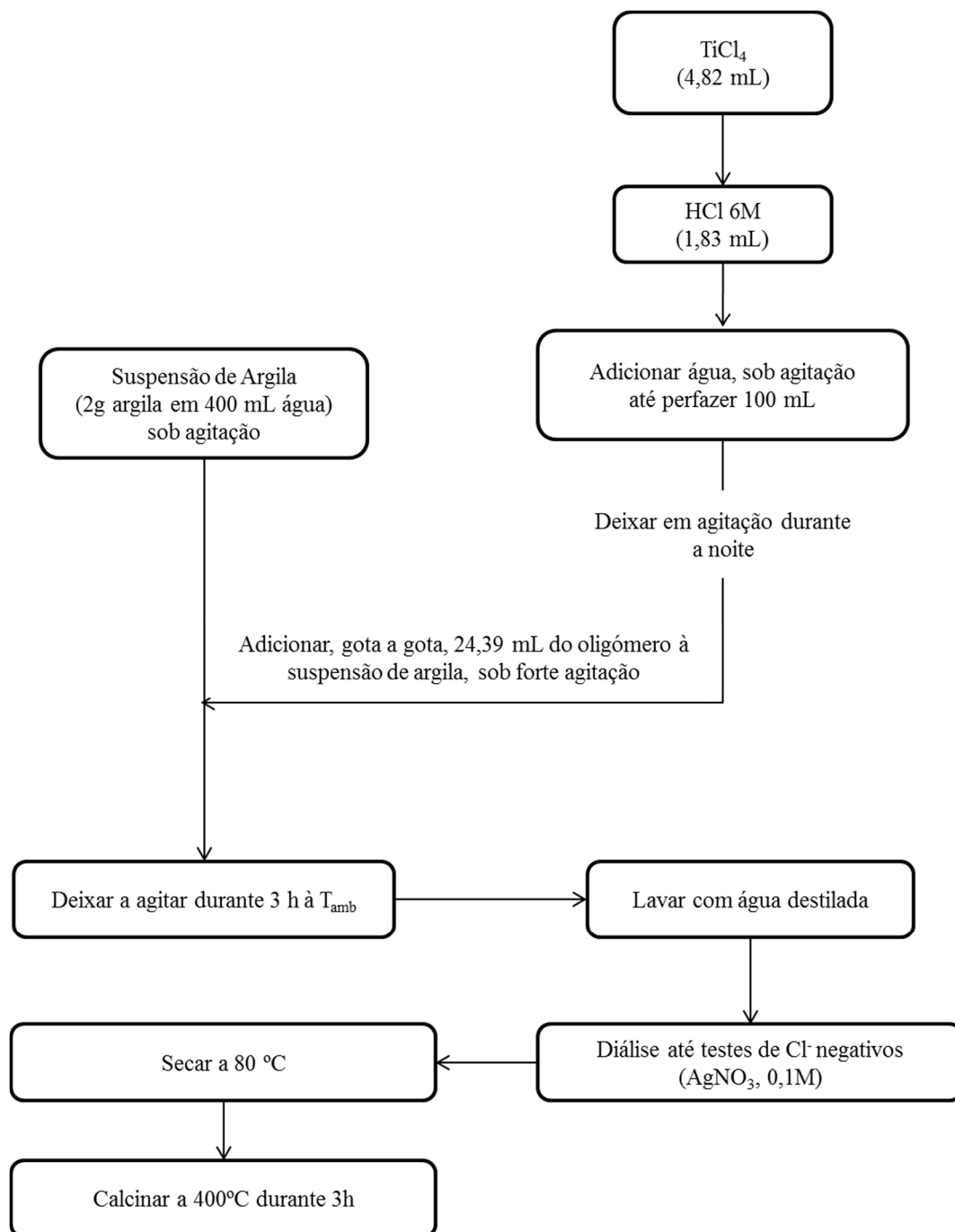
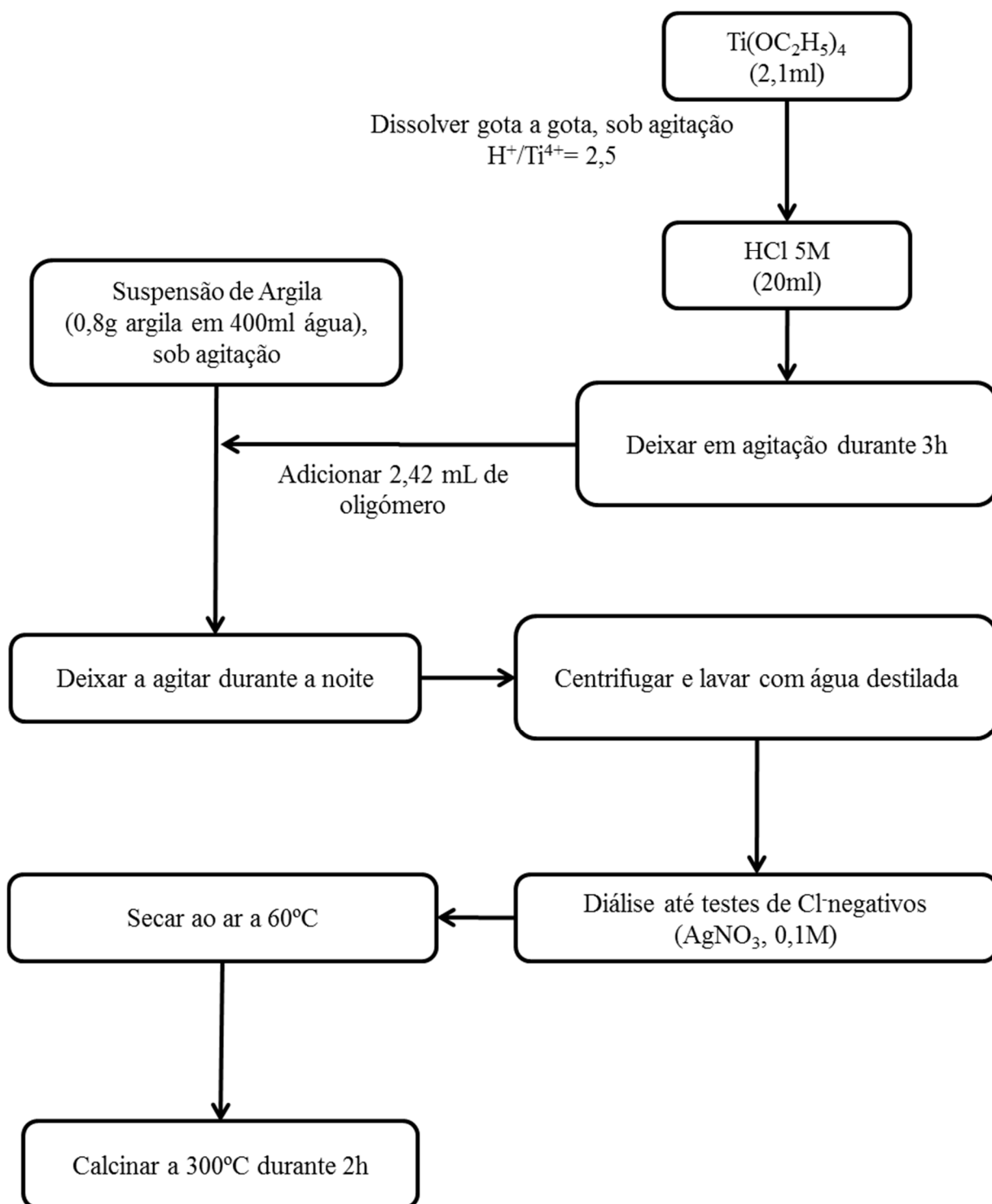


Figura A.I. 2 - Intercalação com Cloreto de Titânio



Anexo A.I. 1 - Intercalação com Etóxido de Titânio



Anexo II – Ensaios Eletroquímicos

Tal como descrito na secção IV.5 recorreu-se a ensaios eletroquímicos, nomeadamente com um sensor de NO, para quantificar o teor de NO libertado nas amostras preparadas. Antes disso, o sensor foi calibrado e testado com uma solução de nitrito.

A.II.1 - Calibração do eléctrodo de NO

A câmara do eléctrodo foi cheia com 2 mL de KI/H₂SO₄ 0,1 M, desarejada durante 2 minutos e sob agitação foram feitas as sucessivas adições de solução padrão (NaNO₂ 50 µM), de modo a se obter a curva de calibração –Figura A.II. 1

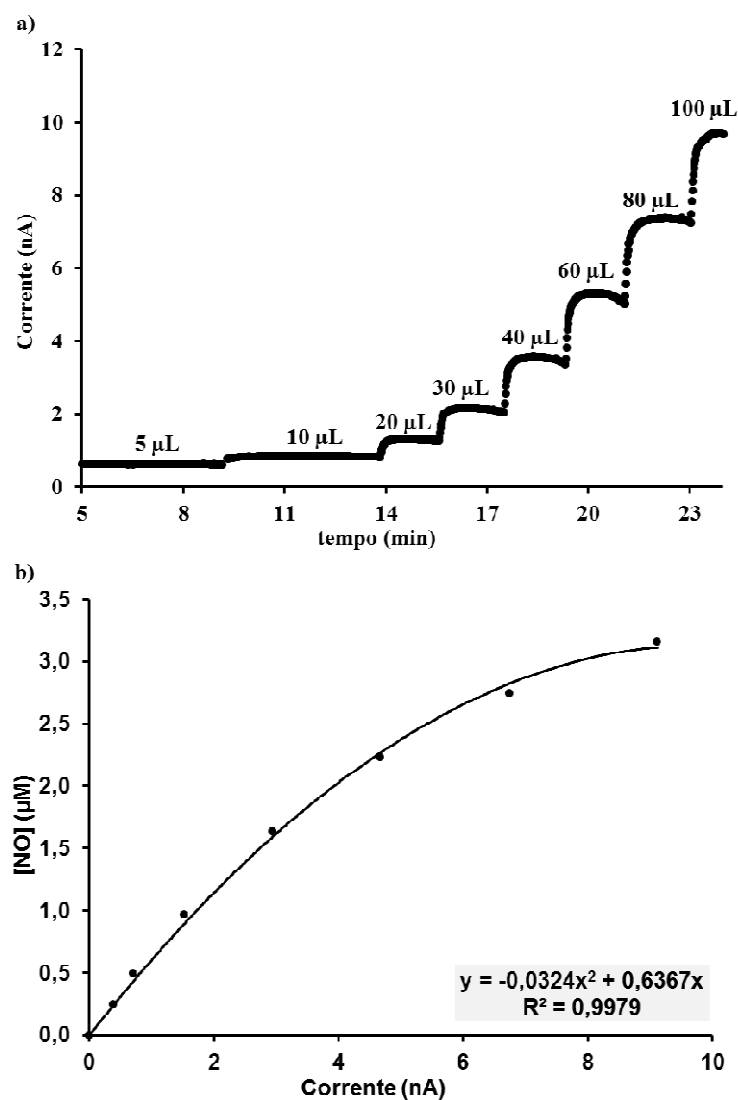


Figura A.II. 1 – a) Diferença de corrente com a adição de cada alíquota, b) Curva de calibração.

Da Figura A.II. 1 a) pode observar-se que o sinal do elétron é mais estável para concentrações de NO mais baixas, pois nas primeiras alíquotas, uma vez atingido o patamar de equilíbrio o sinal mantém-se constante. Para adições de concentração mais elevada, uma vez atingido o máximo de corrente, esta começa a descer ao fim de muito pouco tempo. A curva de calibração obtida pode ser observada na Figura A.II. 1 b).

A.II.2 – Ensaios de estabilidade do sinal do elétron

Previamente aos ensaios com as amostras fizeram-se alguns testes com a adição de nitrito, de modo a ver a estabilidade do conjunto câmara/sensor, como se pode observar, na Figura A.II. 2 onde se encontram os resultados de apenas alguns dos ensaios efetuados. Na Figura A.II. 2 a) pode observar-se que após a adição de 20 µL de solução nitrito (12.05.14) a corrente aumentou atingindo um patamar que se manteve aproximadamente constante durante 4 h. Nas repetições seguintes a corrente embora não tenha mantido o patamar foi decrescendo de forma lenta.

Fizeram-se ensaios com a adição de um volume superior de solução nitrito - Figura A.II. 2 b). Com a adição de 40 µL a corrente aumentou com a adição de solução nitrito para, uma vez atingido o máximo de variação de corrente, começar a baixar. Dos vários ensaios efetuados, verificou-se que embora o sensor se apresente mais sensível para concentrações de NO mais baixas, não se consegue uma estabilidade do sinal na câmara do elétron. Seria de esperar que o NO formado se mantivesse na câmara e, portanto, que a corrente se mantivesse constante ao longo do tempo. No entanto, tal não aconteceu o que levou a concluir que a câmara não deverá ser completamente estanque, libertando algum do NO que se forma ou que este, de alguma maneira reaja diminuindo assim a sua concentração.

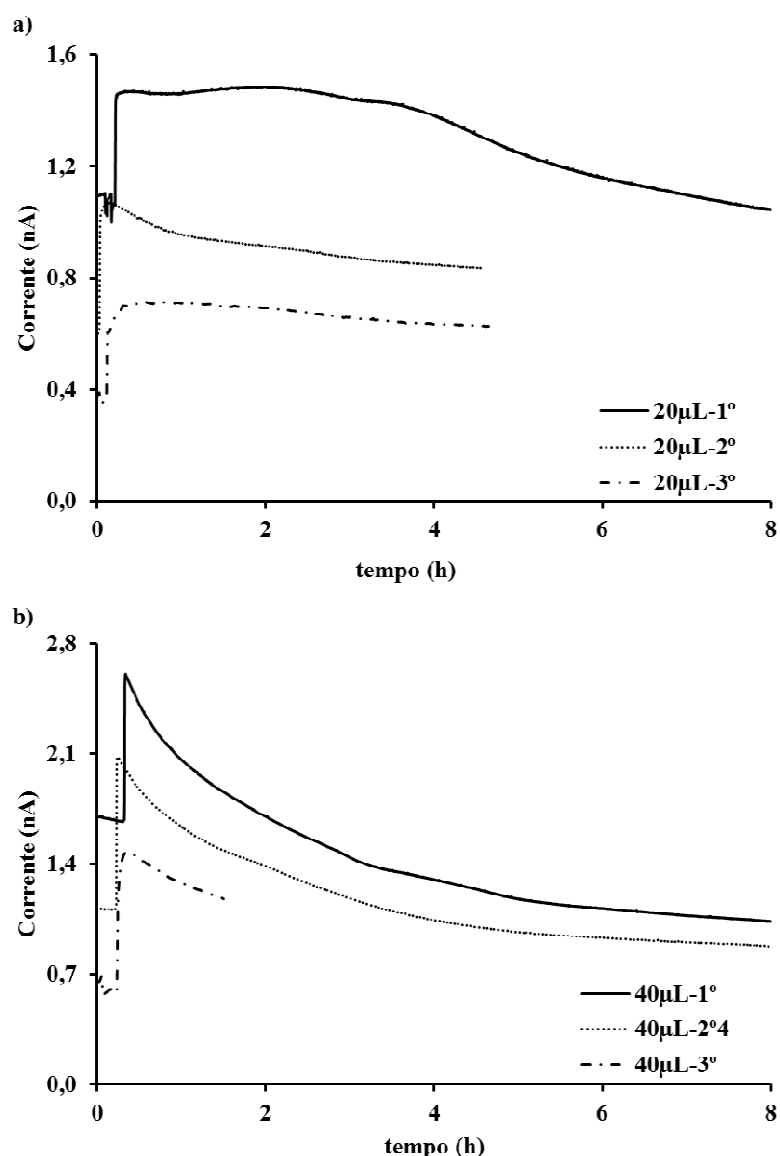


Figura A.II. 2 - Ensaios de libertação de NO. a) repetições da adição de 20 µL de solução nitrito, b) repetições da adição de 40 µL de solução nitrito.

A.II.3 – Libertação de NO de amostras

Após os resultados obtidos com a solução nitrito testou-se a libertação de NO numa das amostras preparadas. Escolheu-se a amostra L-HM1 de entre os materiais que apresentaram melhores resultados. Na Figura A.II. 3 podem observar-se os resultados da libertação de NO da amostra L-HM1. Como se se pode observar após a adição da amostra houve um aumento de corrente que, uma vez atingido o máximo, começou logo a decrescer e de forma bastante rápida atingindo a linha de base ao fim de 20 e 10 minutos para, 5 e 18 mg de L-HM1, respetivamente.

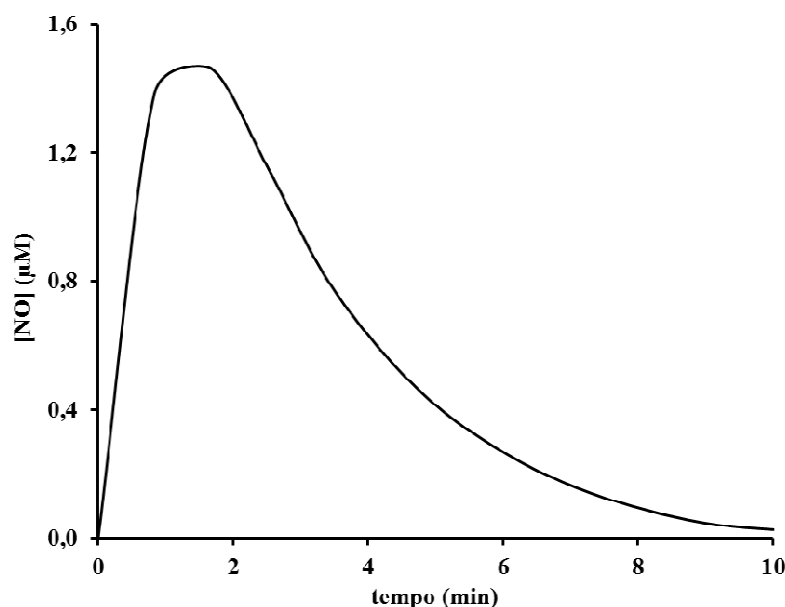


Figura A.II. 3 - Libertação de NO da amostra L-HM1.

A adição de 18 mg de L-HM1 originou um aumento de corrente superior, em relação à linha de base respetiva, do que a adição de apenas 5 mg. Tal facto sugere que maiores quantidades de L-HM1 libertar maior teor de NO, como seria de esperar. Como referido anteriormente, quando analisada a Figura A.II. 2, o sinal do eléctrodo parece ser mais estável para teores de NO mais baixos. No caso de teores de NO mais elevados pode começar a haver libertação de NO da câmara ou, mais provavelmente, poderá ocorrer a reação de oxidação com o oxigénio uma vez que a cinética desta reação depende fortemente da concentração de NO. Do mesmo modo se verificou na Figura A.II. 3 que no ensaio com menor teor de L-HM1 se demorou mais tempo a atingir a linha de base. Em qualquer um dos casos, a linha de base foi atingida nos primeiros 30 minutos do ensaio.

Determinou-se a concentração de NO libertado da amostra L-HM1, do ensaio com 18 mg da amostra, o resultado encontra-se na Figura A.II. 4. Como se pode observar o teor máximo libertado de NO foi de aproximadamente 1,4 μM , tendo sido atingido ao fim de aproximadamente dois minutos. Este valor corresponde a um teor máximo de NO libertado de 50 $\text{ng}(\text{NO}) / \text{g}(\text{L-HM1})$. Este valor é muito inferior ao obtido em fase líquida em solução de oxi-hemoglobina.

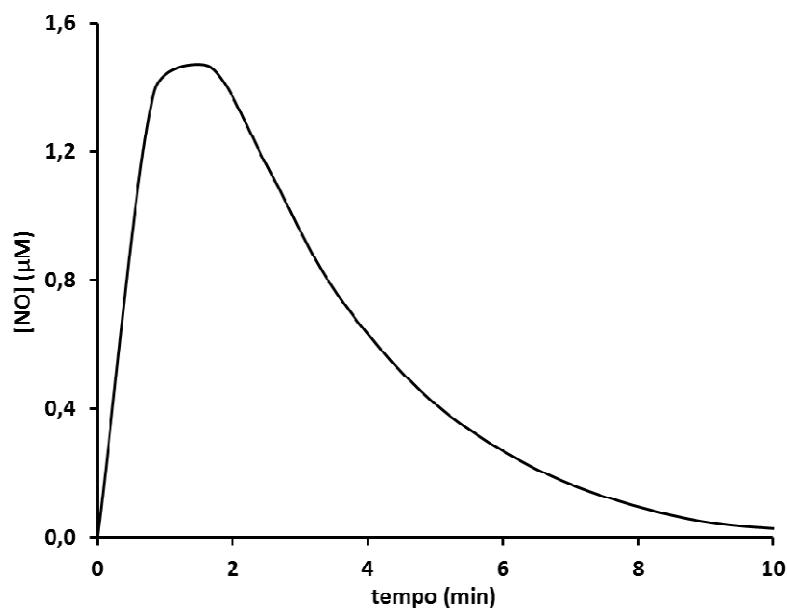


Figura A.II. 4- Concentração de NO libertada da amostra L-HM1 (18 mg).

Nos ensaios de libertação de NO em solução de oxiHb, a amostra L-HM1 libertou um total de $50 \mu\text{g}_{(\text{NO})} / \text{g}_{(\text{L-HM1})}$, ou seja, 1000 vezes mais do que o teor de NO detetado pelo eletrodo. Tal resultado reforça a ideia de que o NO se vai libertando da câmara do eletrodo à medida que se vai libertando ou que se vai consumindo, por reação com algum oxigénio residual que possa estar presente, embora se tenha desarejado a câmara.

A.II.4 – Conclusão

Pelos resultados obtidos aquando da calibração e depois com a adição de solução nitrito pode concluir-se que embora esta técnica permita quantificar o teor de NO presente numa amostra não foi possível manter o teor de NO constante ao longo do tempo o que dificultou a quantificação da concentração de NO libertado. Por outro lado, visto que a libertação de NO a partir dos materiais é lenta, os resultados obtidos não são credíveis, pois parte do NO vai-se consumindo à medida que se vai libertando não chegando a atingir o teor libertado nos ensaios em fase líquida e impossibilitando a obtenção de resultados de cinética de libertação. Esta é uma técnica promissora que, no entanto, necessita de ser melhorada e otimizada.

Anexo III – Isotérmicas de Adsorção de Azoto a - 196 °C

Figura A.III. 1 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a montorilonite.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,003	0,121	0,350	0,297	0,902	0,789
0,006	0,153	0,399	0,317	0,792	0,618
0,021	0,184	0,449	0,337	0,702	0,538
0,046	0,201	0,499	0,357	0,602	0,478
0,073	0,212	0,549	0,382	0,503	0,406
0,099	0,220	0,598	0,406	0,401	0,338
0,150	0,235	0,699	0,465	0,354	0,318
0,200	0,249	0,797	0,551		
0,250	0,264	0,901	0,735		
0,300	0,279	0,949	0,935		

Figura A.III. 2 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoAl-P.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	0,449	0,201	1,922	0,899	3,201
0,001	0,649	0,301	2,014	0,789	2,775
0,002	0,835	0,401	2,104	0,685	2,584
0,002	0,896	0,451	2,152	0,583	2,457
0,003	0,953	0,500	2,200	0,501	2,369
0,005	1,202	0,550	2,247	0,453	2,194
0,007	1,313	0,600	2,299	0,398	2,129
0,011	1,418	0,650	2,357		
0,019	1,534	0,700	2,422		
0,033	1,619	0,750	2,502		
0,045	1,667	0,800	2,605		
0,057	1,703	0,850	2,750		
0,075	1,745	0,899	2,987		
0,101	1,793	0,947	3,477		
0,126	1,832	0,972	4,181		
0,151	1,866				

Figura A.III. 3 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Al-P.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	0,455	0,126	2,986	0,895	4,300
0,001	0,678	0,151	3,029	0,787	3,952
0,001	0,896	0,200	3,096	0,683	3,783
0,001	1,108	0,300	3,206	0,583	3,665
0,001	1,279	0,400	3,303	0,550	3,457
0,002	1,399	0,450	3,355		
0,002	1,507	0,500	3,406		
0,002	1,645	0,550	3,457		
0,005	2,066	0,600	3,509		
0,008	2,255	0,650	3,563		
0,010	2,358	0,700	3,625		
0,020	2,585	0,750	3,699		
0,033	2,699	0,800	3,792		
0,045	2,767	0,850	3,921		
0,057	2,816	0,899	4,126		
0,075	2,874	0,948	4,540		
0,101	2,936	0,973	5,089		

Figura A.III. 4 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Ti(Et)-P.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\,g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\,g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\,g^{-1}$
0,000	0,453	0,150	2,737	0,888	4,606
0,001	0,649	0,200	2,933	0,784	4,357
0,001	0,832	0,301	3,176	0,683	4,211
0,002	0,900	0,399	3,333	0,601	4,118
0,002	0,982	0,468	3,426	0,501	4,005
0,003	1,044	0,500	3,468	0,456	3,468
0,005	1,356	0,550	3,527	0,399	3,333
0,008	1,540	0,600	3,586		
0,010	1,635	0,650	3,646		
0,019	1,848	0,700	3,712		
0,032	2,000	0,750	3,790		
0,045	2,107	0,800	3,889		
0,050	2,145	0,850	4,028		
0,075	2,322	0,900	4,247		
0,099	2,476	0,949	4,670		
0,125	2,616	0,974	5,133		

Figura A.III. 5 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Ti(Cl)-P,

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\,g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\,g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\,g^{-1}$
0,000	0,459	0,150	3,146	0,888	4,816
0,001	0,677	0,201	3,379	0,7837	4,614
0,001	0,878	0,301	3,705	0,682	4,502
0,001	0,991	0,400	3,920	0,582	4,416
0,002	1,092	0,468	4,032	0,501	4,344
0,002	1,135	0,500	4,079	0,468	4,032
0,002	1,228	0,550	4,142		
0,005	1,581	0,600	4,199		
0,008	1,792	0,650	4,254		
0,010	1,897	0,700	4,312		
0,020	2,135	0,750	4,375		
0,032	2,308	0,800	4,454		
0,045	2,428	0,850	4,558		
0,050	2,472	0,900	4,712		
0,075	2,673	0,949	5,010		
0,099	2,844	0,975	5,364		
0,125	3,005				

Figura A.III. 6 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a wCoTiCl-P,

Adsorção		Desadsorção			
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	0,223	0,125	2,861	0,891	4,978
0,001	0,452	0,150	3,007	0,785	4,740
0,001	0,658	0,200	3,277	0,683	4,607
0,001	0,856	0,300	3,688	0,602	4,518
0,002	0,868	0,400	3,958	0,501	4,413
0,002	0,965	0,467	4,092	0,467	4,092
0,002	1,017	0,500	4,150		
0,002	1,094	0,550	4,226		
0,005	1,413	0,600	4,293		
0,007	1,655	0,650	4,359		
0,010	1,789	0,700	4,425		
0,022	2,057	0,750	4,497		
0,033	2,184	0,800	4,586		
0,044	2,296	0,850	4,700		
0,050	2,343	0,900	4,866		
0,075	2,532	0,949	5,175		
0,099	2,699	0,974	5,538		

Figura A.III. 7 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a dCoTiCl-P,

Adsorção		Desadsorção			
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	0,228	0,125	2,678	0,889	4,675
0,001	0,454	0,150	2,815	0,785	4,418
0,001	0,655	0,200	3,069	0,683	4,277
0,001	0,845	0,301	3,452	0,582	4,168
0,002	0,921	0,401	3,691	0,501	4,082
0,002	0,973	0,468	3,808	0,452	3,866
0,002	1,049	0,500	3,858	0,398	3,726
0,005	1,358	0,550	3,927		
0,008	1,583	0,600	3,992		
0,010	1,666	0,650	4,056		
0,019	1,886	0,700	4,121		
0,033	2,044	0,750	4,195		
0,045	2,152	0,800	4,285		
0,050	2,191	0,850	4,405		
0,075	2,370	0,900	4,580		
0,099	2,526	0,949	4,900		

Figura A.III. 8 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a Sepiolite.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,0001	0,455	0,150	1,676	0,894	5,924
0,001	0,637	0,201	1,802	0,789	3,944
0,001	0,670	0,300	2,041	0,693	3,270
0,002	0,730	0,400	2,292	0,589	2,822
0,002	0,759	0,450	2,426	0,503	2,539
0,003	0,808	0,500	2,564	0,452	2,373
0,005	0,960	0,550	2,712	0,400	2,223
0,008	1,041	0,600	2,877	0,300	2,041
0,011	1,090	0,650	3,069		
0,020	1,188	0,700	3,296		
0,030	1,256	0,750	3,583		
0,040	1,313	0,800	3,965		
0,050	1,360	0,849	4,526		
0,074	1,451	0,898	5,482		
0,100	1,535	0,952	8,444		
0,125	1,608	0,971	11,394		

Figura A.III. 9 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a AIS P.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,004	1,626	0,347	3,054	0,902	5,946
0,008	1,766	0,397	3,177	0,798	4,854
0,020	1,973	0,447	3,303	0,690	4,255
0,048	2,187	0,497	3,439	0,602	3,906
0,073	2,313	0,547	3,581	0,503	3,594
0,098	2,408	0,596	3,738	0,404	3,195
0,147	2,560	0,696	4,096	0,341	3,031
0,196	2,693	0,799	4,613		
0,247	2,815	0,899	5,601		
0,297	2,934	0,947	6,651		

Figura A.III. 10 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a ZnS.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,001	0,431	0,200	1,712	0,896	5,875
0,002	0,606	0,300	1,939	0,793	3,817
0,002	0,637	0,401	2,186	0,694	3,090
0,002	0,659	0,451	2,318	0,590	2,622
0,002	0,715	0,501	2,455	0,504	2,328
0,005	0,899	0,552	2,604	0,452	2,156
0,007	0,969	0,602	2,769	0,400	2,001
0,011	1,047	0,652	2,960	0,300	1,939
0,020	1,149	0,702	3,192		
0,029	1,219	0,750	3,466		
0,040	1,275	0,800	3,845		
0,050	1,320	0,849	4,415		
0,075	1,403	0,897	5,386		
0,100	1,475	0,952	8,287		
0,125	1,539	0,971	10,997		
0,151	1,599				

Figura A.III. 11 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoS.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	0,228	0,150	1,916	0,905	7,526
0,001	0,440	0,200	2,066	0,793	4,760
0,001	0,623	0,300	2,355	0,693	3,901
0,001	0,667	0,401	2,657	0,588	3,361
0,002	0,724	0,451	2,818	0,503	3,028
0,002	0,787	0,501	2,985	0,452	2,831
0,002	0,823	0,551	3,166	0,401	2,657
0,005	1,032	0,601	3,364		
0,007	1,104	0,650	3,588		
0,010	1,171	0,700	3,862		
0,020	1,318	0,750	4,204		
0,029	1,405	0,800	4,663		
0,040	1,476	0,849	5,334		
0,050	1,535	0,897	6,469		
0,074	1,646	0,953	9,869		
0,100	1,748	0,973	13,102		
0,125	1,835				

Figura A.III. 12 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a TiZnS-P.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,003	1,000	0,346	2,440	0,903	6,946
0,007	1,151	0,396	2,584	0,800	4,731
0,023	1,402	0,445	2,735	0,694	3,811
0,046	1,552	0,498	2,906	0,588	3,255
0,071	1,667	0,547	3,078	0,501	2,912
0,097	1,751	0,595	3,269	0,402	2,566
0,146	1,894	0,700	3,773	0,341	2,380
0,196	2,033	0,797	4,522		
0,246	2,167	0,901	6,282		
0,296	2,301	0,948	8,419		

Figura A.III. 13 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a TiCoS-P.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	0,458	0,12514	2,116	0,905	8,332
0,001	0,676	0,15013	2,210	0,802	5,547
0,001	0,863	0,19992	2,379	0,698	4,488
0,001	0,902	0,29919	2,693	0,591	3,846
0,002	0,969	0,39965	3,019	0,505	3,462
0,002	1,007	0,45013	3,195	0,452	3,245
0,003	1,064	0,50019	3,381	0,450	3,195
0,005	1,241	0,55008	3,582		
0,008	1,343	0,60000	3,805		
0,011	1,403	0,64990	4,063		
0,020	1,544	0,69986	4,370		
0,030	1,637	0,74963	4,749		
0,040	1,713	0,79924	5,253		
0,050	1,779	0,84866	5,970		
0,074	1,904	0,89671	7,122		
0,100	2,019	0,95398	10,315		

Figura A.III. 14 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoAS-A.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	0,697	0,125	2,538	0,883	4,150
0,001	0,917	0,151	2,604	0,782	4,097
0,001	1,130	0,200	2,713	0,682	4,059
0,001	1,331	0,300	2,892	0,600	4,027
0,001	1,408	0,400	3,054	0,500	3,984
0,002	1,490	0,452	3,139	0,448	3,264
0,002	1,536	0,500	3,227	0,399	3,107
0,003	1,603	0,550	3,318		
0,005	1,783	0,600	3,414		
0,008	1,854	0,650	3,518		
0,011	1,930	0,700	3,632		
0,020	2,048	0,750	3,755		
0,030	2,136	0,800	3,882		
0,040	2,206	0,850	4,004		
0,050	2,265	0,900	4,105		
0,075	2,373	0,950	4,198		
0,100	2,463	0,975	4,279		

Figura A.III. 15 - Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoOS.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol\ g^{-1}$
0,000	1,158	0,150	3,0878	0,883	5,106
0,001	1,369	0,200	3,255	0,782	5,052
0,001	1,570	0,299	3,567	0,681	5,009
0,001	1,646	0,400	3,877	0,600	4,972
0,002	1,745	0,450	4,030	0,500	4,925
0,002	1,783	0,500	4,180	0,447	4,209
0,002	1,857	0,550	4,329	0,395	3,892
0,006	2,074	0,600	4,476	0,299	3,567
0,008	2,148	0,650	4,623		
0,011	2,237	0,700	4,765		
0,020	2,376	0,750	4,891		
0,030	2,482	0,800	4,991		
0,040	2,566	0,850	5,058		
0,050	2,638	0,900	5,100		
0,074	2,774	0,950	5,154		
0,100	2,893	0,975	5,209		
0,125	2,995				

Figura A.III. 16- Isotérmica de adsorção de azoto a -196 °C para a CoS-B.

Adsorção				Desadsorção	
p/p^0	n^{ads} $mmol g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol g^{-1}$	p/p^0	n^{ads} $mmol g^{-1}$
0,004	0,240	0,347	0,634	0,901	1,811
0,008	0,277	0,397	0,677	0,792	1,526
0,022	0,326	0,447	0,721	0,703	1,372
0,047	0,372	0,496	0,773	0,604	1,247
0,071	0,403	0,546	0,824	0,503	1,126
0,097	0,430	0,596	0,876	0,402	0,700
0,147	0,473	0,696	0,997	0,341	0,643
0,197	0,514	0,800	1,200		
0,247	0,552	0,899	1,592		
0,297	0,593	0,950	2,050		

Anexo IV – Espectros UV-Vis e IV

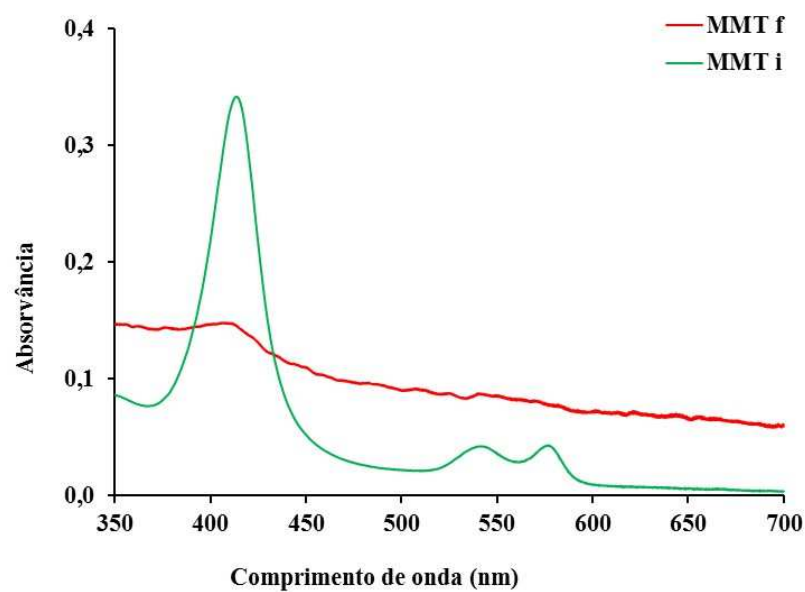


Figura A.IV. 1 - Espectro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra MMT.

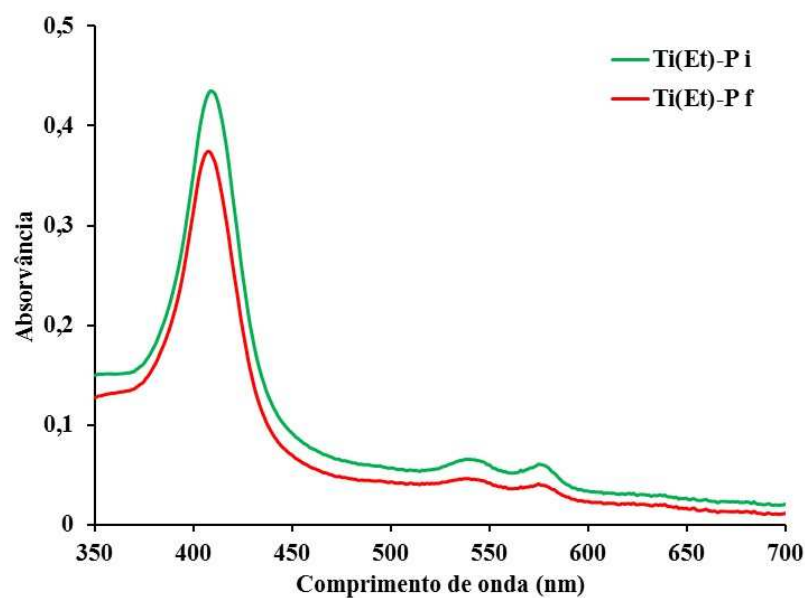


Figura A.IV. 2 - Espectro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra Ti(Et)-P.

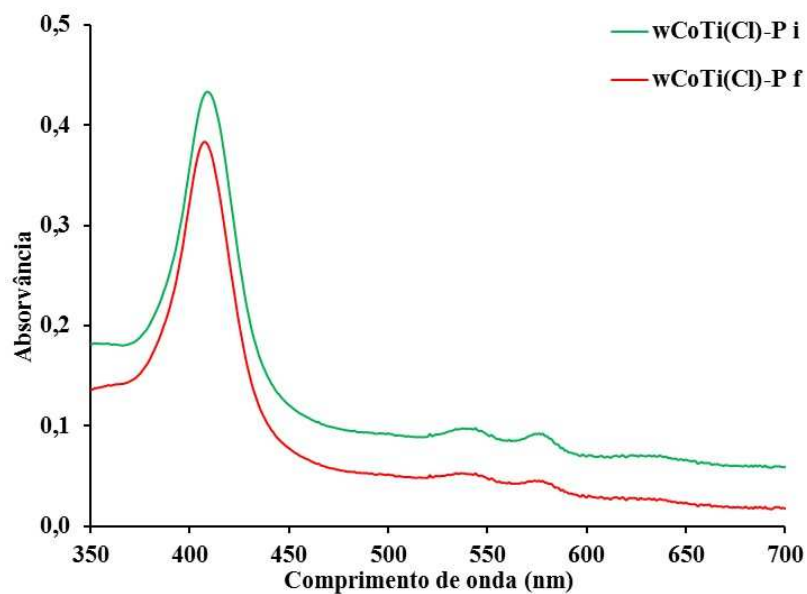


Figura A.IV. 3 - Espectro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra wCoTi(Cl)-P.

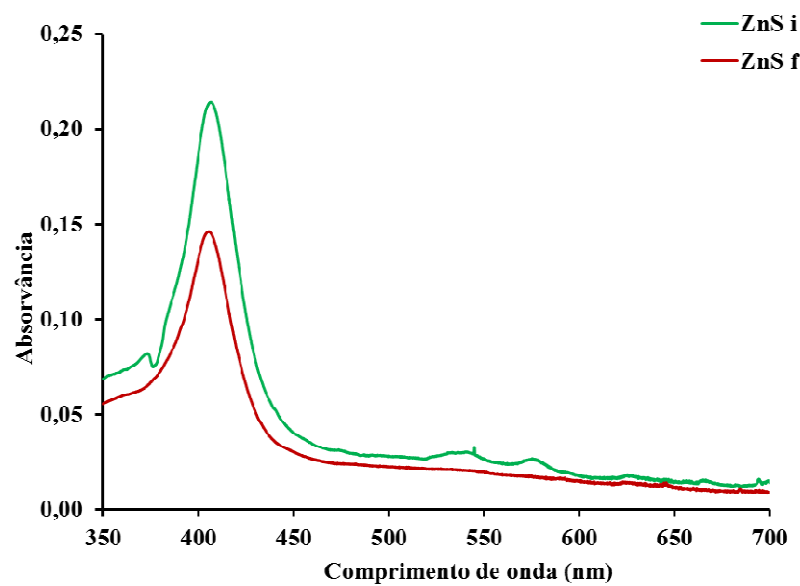


Figura A.IV. 4 - Espectro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra ZnS.

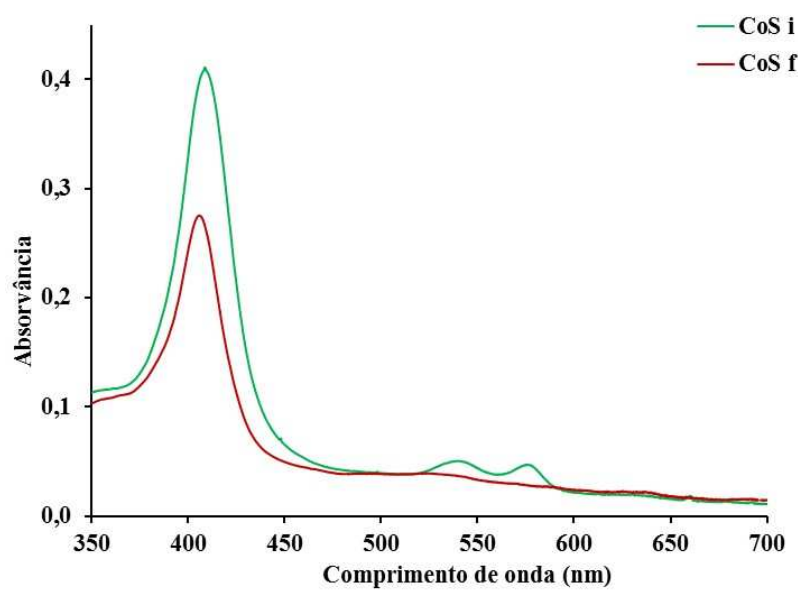


Figura A.IV. 5 - Espectro de UV-Vis da hemoglobina inicial (i) e final (f) após 2 h de ensaio de liberação de NO da amostra CoS.

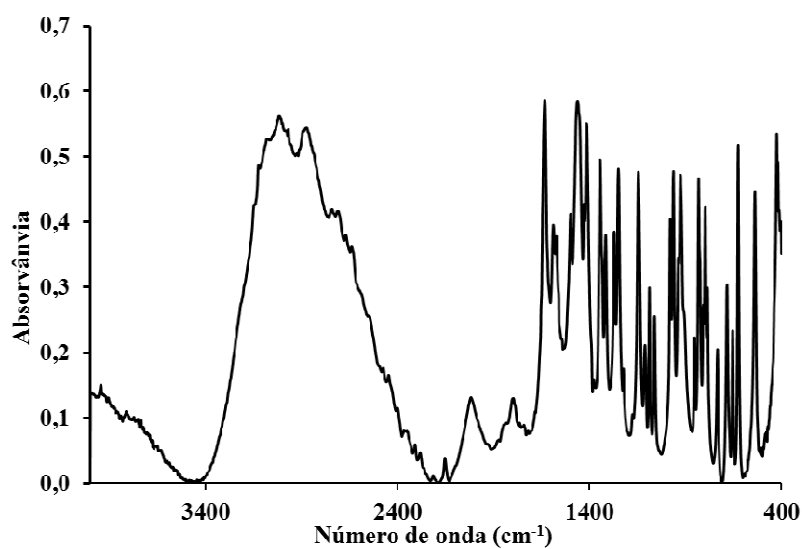


Figura A.IV. 6- Espectro de infravermelho da L-histidina.

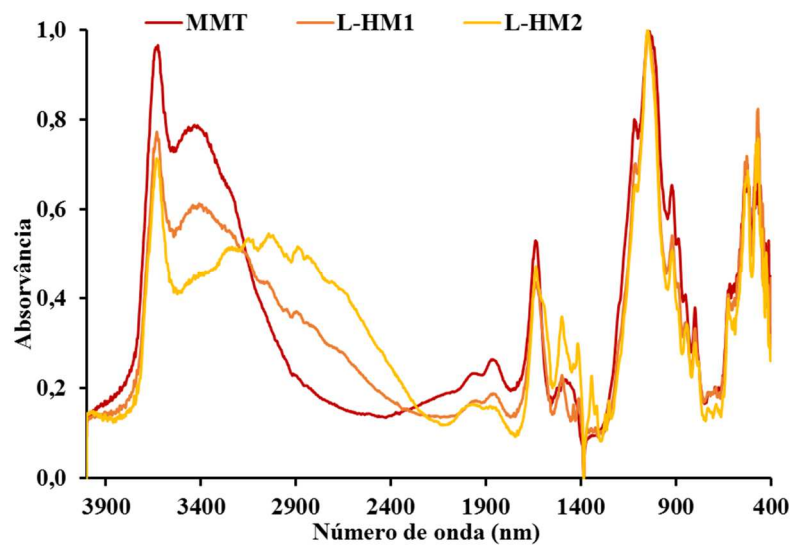


Figura A.IV. 7 - Espectro de infravermelho da Montmorilonite e das amostras L-HM1 e L-HM2.

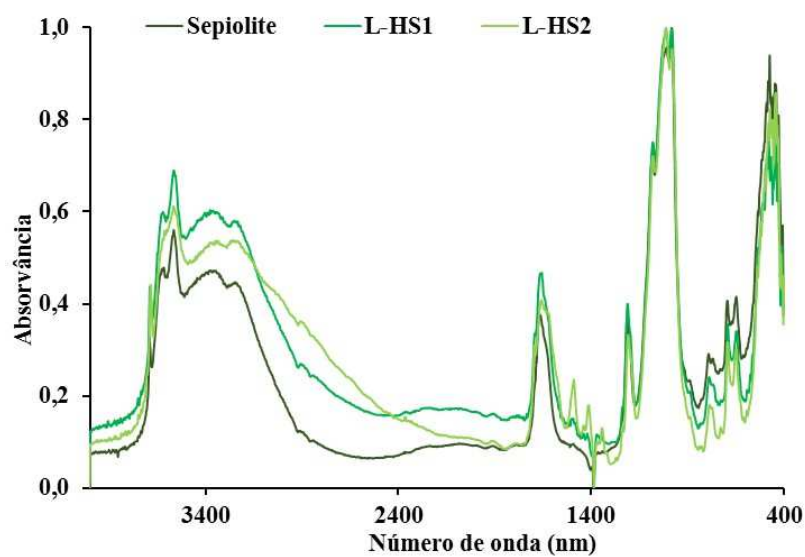


Figura A.IV. 8 - Espectro de infravermelho da Sepiolite e das amostras L-HS1 e L-HS2.

Anexo V – Comunicações Orais no Âmbito desta Tese

Anexo VI – Artigos publicados no âmbito desta tese

Anexo VII – Outros artigos